

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Biologia Vegetal



Estudo do papel da imunidade inata nas infecções
por micobactérias

Sara Diana Ferreira de Sousa

Dissertação do Mestrado

Mestrado em Biologia Molecular e Genética

2014

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Biologia Vegetal



Estudo do papel da imunidade inata nas infecções por micobactérias

Sara Diana Ferreira de Sousa

Dissertação orientada por:

Dr.^a Luísa Jordão, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

Prof.^a Dr.^a Margarida Telhada, Faculdade de Ciências da Universidade de
Lisboa

Dissertação do Mestrado

Mestrado em Biologia Molecular e Genética

2014

A presente dissertação não foi redigida segundo o novo Acordo Ortográfico da
Língua Portuguesa por opção do autor.

ÍNDICE

| | |
|---|------|
| Agradecimentos | vi |
| Comunicações em conferências científicas | vii |
| Resumo | viii |
| <i>Abstract</i> | ix |
| Lista de Abreviaturas | x |
| Índice de Figuras e Tabelas | xi |
| | |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1. Infecções causadas por micobactérias | 2 |
| 1.2. Agentes etiológicos | 2 |
| 1.2.1. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | 2 |
| 1.2.2. Micobactérias Não Tuberculosas (MNT) | 2 |
| <i>Mycobacterium avium</i> | 2 |
| <i>Mycobacterium smegmatis</i> | 3 |
| <i>Mycobacterium fortuitum</i> | 3 |
| <i>Mycobacterium abscessus</i> | 3 |
| 1.3. Interação Micobactéria-Hospedeiro | 3 |
| 1.4. O sistema imunitário e a persistência das micobactérias | 4 |
| 1.4.1. Produção de agentes oxidativos | 4 |
| 1.4.2. Maturação e acidificação do fagossoma | 5 |
| 1.4.3. Autofagia | 6 |
| 1.4.4. Morte celular: Apoptose e Necrose | 6 |
| 1.4.5. A produção de citocinas | 7 |
| 1.5. Objectivos deste trabalho | 7 |
| | |
| 2. MÉTODOS E MATERIAIS | |
| 2.1. Cultura de Micobactérias | 8 |
| 2.2. Marcação de MNTs com um composto fluorescente | 8 |
| 2.3. Cultura de células | 8 |
| 2.4. Indução da diferenciação das células THP-1 com ésteres de forbol | 9 |
| 2.5. Infecção de macrófagos alveolares com MNTs | 9 |
| 2.5.1. Preparação dos inóculos micobacterianos | 9 |
| 2.5.2. Tempos de infecção | 9 |
| 2.6. Aferição do inóculo inicial | 9 |
| 2.7. Persistência das micobactérias em macrófagos alveolares | 10 |

| | | |
|---------|---|----|
| 2.8. | Caracterização do fagossoma micobacteriano | 10 |
| 2.8.1. | Acidificação dos fagossomas | 10 |
| 2.8.2. | Aquisição de marcadores tardios da maturação do fagossoma | 10 |
| 2.9. | Crescimento das micobactérias a diferentes pHs | 11 |
| 2.10. | Produção de mediadores da resposta inflamatória | 12 |
| 2.10.1. | Avaliação da produção de IL-10 | 12 |
| 2.10.2. | Avaliação da produção de NO | 12 |
| 2.11. | Morte celular | 12 |
| 2.12. | Análise estatística | 14 |
| 3. | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 15 |
| 3.1. | Persistência das MNTs num modelo de macrófagos alveolares | 15 |
| 3.2. | Caracterização do fagossoma micobacteriano | 17 |
| 3.3. | Crescimento das micobactérias a diferentes pHs | 22 |
| 3.4. | Produção de mediadores da resposta inflamatória | 23 |
| 3.5. | Morte celular dos macrófagos alveolares infectados. | 25 |
| 4. | CONCLUSÕES | 28 |
| 5. | PERSPECTIVAS FUTURAS | 29 |
| 6. | BIBLIOGRAFIA | 30 |
| 7. | ANEXOS | 34 |
| | Anexos I | 35 |
| | Anexos II | 36 |

AGRADECIMENTOS

Quero começar por agradecer à Professora Margarida Telhada, por ter aceite ser minha orientadora interna e pela disponibilidade mostrada.

À minha orientadora externa, Doutora Luísa Jordão, pela oportunidade que me deu de trabalhar consigo, por todo o conhecimento e sabedoria que me transmitiu ao longo deste ano, por todo o apoio prestado na realização deste trabalho. E também pela confiança e bem-estar transmitido que me permitiu a realização deste trabalho motivada até ao fim.

Agradeço, também, ao Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge por me permitir o uso das suas instalações para a realização do meu trabalho. Expressando também a minha gratidão a todas as pessoas do Departamento de Doenças Infecciosas por me terem acolhido durante este ano nos seus laboratórios. Um especial obrigado à Doutora Fátima Martins, pela ajuda prestada no citómetro.

Por fim, quero agradecer a paciência, incentivo, apoio e amizade durante esta etapa de toda a minha família e amigos. Um muito especial obrigado a minha mãe e irmã sem as quais nada seria possível.

COMUNICAÇÕES EM CONFERÊNCIAS CIENTÍFICAS.

- Sara Sousa, Fátima Martins e Luísa Jordão. (2014). Innate immune response during NTM infections. *FEBS Journal*. **281** (suppl. 1): 135. (Poster apresentado durante FEBS-EMBO 2014 Conference, Paris, France).

RESUMO

Desde os primórdios da humanidade que existem relatos de infecções respiratórias causadas por micobactérias. A incidência de infecções por Micobactérias Não-Tuberculosas (MNT), consideradas oportunistas, tem aumentado gradualmente atingindo sobretudo a população imunodeprimida.

As MNTs são maioritariamente ambientais e ubíquas. Sendo o difícil diagnóstico, a resistência aos antibióticos e o escasso conhecimento da patogenicidade destas micobactérias, os principais impulsores do seu estudo.

Os macrófagos alveolares, em infecções do sistema respiratório, são as primeiras células do sistema imunitário que contactam com as MNTs. Estes irão desencadear de imediato uma resposta imunitária inata.

Este trabalho teve como principal objectivo avaliar a resposta imunitária durante uma infecção com MNTs utilizando células THP-1 como modelo de macrófagos alveolares humanos. Para tal, foi avaliada a sobrevivência de algumas MNTs no interior dos macrófagos, seguida do estudo de vários componentes da resposta imunitária: maturação do fagossoma; produção de molécula pró-inflamatórias; e indução da morte celular.

Foi possível observar a existência de 3 perfis de persistência intracelular: *M. smegmatis* é eliminado; *M. fortuitum* ATCC6841 apresenta um perfil de latência; o *M. fortuitum* 747/08, *M. abscessus* 549/08, *M. avium* ATCC25291 e *M. avium* 60/08 apresentam um perfil de crescimento. A maturação dos fagossomas de MNT é bloqueada duma forma menos eficiente do que a dos fagossomas de *M. tuberculosis*. Apenas o *M. avium* 60/08 foi capaz de induzir a produção de NO e IL-10. E ainda que existe a indução da apoptose diferenciada entre as estirpes estudadas, sendo o *M. avium* 60/08 o melhor indutor.

Palavras-chave: Micobactérias não-tuberculosas, interação micobactéria-hospedeiro, resposta imunitária inata, morte celular.

ABSTRACT

Mycobacteria respiratory infections are described since the dawn of humanity. Non-tuberculous Mycobacteria (NTM) infections have been gradually increasing, being regarded as opportunistic this mycobacteria affect mostly immunocompromised individuals.

The majority of NTMs are environmental and ubiquitous. A difficult diagnosis, antibiotic resistance and the lack of knowledge about pathogenesis of these mycobacteria, are the main impellers of their study.

The alveolar macrophages, in respiratory system infections, are the first immune system cells to contact with the NTM triggering the innate immune response.

This work aimed to evaluate the immune response during NTM infection using THP-1 cells as a model of human alveolar macrophages. The survival of several NTMs within macrophages was evaluated. The role played by different immune response mechanisms such as phagosome maturation, production of inflammatory mediators and induction of cell death in NTM fate was also evaluated.

Three different intracellular persistence profiles were observed. *M. smegmatis* was cleared; *M. fortuitum* ATCC6841 presented a profile of latency; *M. fortuitum* 747/08, *M. abscessus* 549/08, *M. avium* ATCC25291 and *M. avium* 60/08 were able to replicate. It was found that maturation block for NTM phagosome was less efficient than *M. tuberculosis*. Only *M. avium* 60/08 was able to trigger NO and IL-10 production. It was also found that there is induction of apoptosis among the studied strains, being *M. avium* 60/08 the best inducer.

Keywords: Non-Tuberculous Mycobacteria, mycobacteria-host interactions, innate immune response, cellular death.

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-----------------|---|
| °C | Graus Celsius |
| 7- AAD | 7- AminoActinomicina D |
| ADN | Ácido Desoxirribonucleico |
| ATP | Adenosina tri-fosfato |
| CO ₂ | Dióxido de carbono |
| CTR | Controlo |
| <i>g</i> | Força G |
| GFP | Proteína verde fluorescente do inglês Green Fluorescent Protein |
| IL | Interleucina |
| INF | Interferão |
| Lamp-1 | Proteína membrana associada a lisossomas 1 |
| LPS | Lipopolissacarídeo |
| Min | Minutos |
| MNT | Micobactéria Não-Tuberculosa |
| MOI | Multiplicidade de infecção |
| NO | Óxido Nítrico |
| OADC | Oleato albumina dextrose catálase |
| OD | Densidade óptica |
| OG | Oregon Green, composto fluorescente |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| PBS | Tampão fosfato 0,01M pH 7,4 |
| P.e. | Por exemplo |
| PFA | Para-formaldeído |
| PI | Iodeto de propídeo |
| PMA | 12- Miristato 13-Acetato de forbol |
| RNI | Radicais livres de azoto |
| Rpm | Rotações por minuto |
| SFB | Soro Fetal Bovino |
| TNF | Factor de Necrose Tumoral do inglês Tumor necrosis factor |
| UFC | Unidades formadoras de colónias |
| VIH | Vírus da Imunodeficiência Humana |

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Esquema simplificado da via endocítica (fagocitose). | 4 |
| Figura 2. Curvas de sobrevivência das estirpes MNTs. | 16 |
| Figura 3. Acidificação dos fagossomas de MNTs. | 18 |
| Figura 4. Avaliação de marcadores de endossomas tardios e de lisossomas. | 21 |
| Figura 5. Cinética de crescimento do <i>M. smegmatis</i> em diferentes pHs. | 23 |
| Figura 6. Activação d caspases envolvidas na indução da via apoptótica. | 26 |
| Figura Suplementar 1. Cinéticas de crescimento a diferentes pHs das estirpes MNTs em estudo. | 36 |
| Figura Suplementar 2. Cinética de crescimento das estirpes <i>M. fortuitum</i> em estudo a pH 4,6 a partir de UFCs. | 37 |
| Tabela 1. Crescimento a diferentes pHs das estirpes de MNTs em estudo. | 23 |
| Tabela Suplementar 1. Composição dos meios utilizados no trabalho. | 35 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. Infecções causadas por micobactérias.

As infecções provocadas por micobactérias são das doenças mais antigas que afectam a humanidade, estando descritas há mais de 4000 anos^{24,32}. A tuberculose e a lepra são as mais conhecidas. Sintomas da tuberculose, conhecida então como tísica pulmonar, podem ser lidos em apontamentos de Hipócrates^{24,32}. A descoberta, por Robert Koch do principal agente etiológico da tuberculose em 1882, *Mycobacterium tuberculosis*, trouxe um grande avanço na microbiologia destas infecções.

Actualmente, a tuberculose continua a ser uma das principais causas de morbilidade e mortalidade em todo o mundo⁶⁴. O aparecimento de estirpes multi-resistentes contribuiu para a persistência desta doença. A implementação de sucessivos programas de controlo da tuberculose pela Organização Mundial de Saúde (OMS) tem garantido um decréscimo sustentado do número de mortes. Desde 1990 a taxa de mortalidade diminui mais de 45%, continuando contudo a ser um problema de saúde pública na Ásia e em África⁶⁴.

Com a diminuição dos casos de tuberculose nos países desenvolvidos, as infecções por micobactérias não-tuberculosas (MNT) têm ganho uma importância crescente na saúde pública. Nos últimos anos foi registado um aumento do número de casos em indivíduos imunocompetentes, mas é principalmente nos indivíduos imunodeprimidos que se verifica uma maior incidência^{45,46,65}. O aumento da população imunodeprimida contribui para o crescimento de infecções por MNTs. A imunodepressão pode ter diversas causas atingindo diversos grupos da população como por exemplo idosos, indivíduos infectados com o Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH), indivíduos com fibrose cística e transplantados.

As MNTs apresentam um tropismo muito diversificado, existem vários casos de infecções nos pulmões, na pele e tecidos moles, ossos e nódulos linfáticos^{46,59}. O diagnóstico incorrecto e consequente tratamento com os antibióticos utilizados para o *M. tuberculosis*, aos quais as MNTs são pouco sensíveis, permite a selecção de estirpes resistentes. A correcta identificação destas micobactérias, bem como o conhecimento da sua patogenicidade e interacção com o hospedeiro humano, contribuirão para o estabelecimento de terapias mais eficazes⁴⁶.

1.2. Agentes etiológicos

1.2.1 *Mycobacterium tuberculosis*

O *Mycobacterium tuberculosis* tem como único hospedeiro o Homem e é o principal agente etiológico da tuberculose. A transmissão ocorre através da inalação de aerossóis expelidos com *M. tuberculosis* por um indivíduo infectado. A dose infecciosa para o *M. tuberculosis* é muito baixa (1 bacilo)¹³. Existem outras micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, como o *M.bovis* e *M.africanum*, capazes de infectar o Homem, no entanto são muito poucos os casos de tuberculose associados a estas estirpes³². Os pulmões são os principais órgãos alvo desta micobactéria, no entanto existem vários casos de tuberculose extra-pulmonar.

M. tuberculosis é uma bactéria intracelular facultativa e aeróbia obrigatória de crescimento lento^{6,30,39}. É um bacilo gram positivo ácido-álcool resistente, que cora dificilmente, devido à parede celular espessa aumentada⁵⁰ por peptidoglicano, arabinogalactano e ácidos micólicos. A parede confere um aumento na resistência desta bactéria, principalmente por ser uma camada hidrofóbica, dificultando a ligação dos agentes terapêuticos aos seus alvos^{6,39,50}.

1.2.2 Micobactérias Não Tuberculosas

As MNTs são um grupo heterogêneo de microrganismos, maioritariamente ambientais, capazes de sobreviver em condições adversas. A incidência das infecções com as diferentes estirpes de MNTs varia com a área geográfica²⁶.

Devido ao número elevado de estirpes, irão ser apenas referenciadas as seleccionadas para a realização deste trabalho.

Mycobacterium avium

Pertence ao complexo *Mycobacterium avium* e é uma micobactéria de crescimento lento, que pode ser encontrada tanto na água como no solo a pH baixo^{45,49}. A sua transmissão ocorre por via respiratória e gastrointestinal, através da ingestão, por exemplo, de água potável contaminada. O Homem não é o seu único hospedeiro, sendo capaz de infectar outros animais como as aves e os suínos⁴⁹.

As infecções com esta micobactéria ocorrem principalmente em indivíduos imunodeprimidos, como por exemplo doentes com VIH, neste caso as infecções disseminadas são a manifestação mais grave e frequente. Nos indivíduos imunocompetentes a ocorrência de doenças a nível respiratório é mais comum em doentes que apresentam lesões pulmonares prévias como a fibrose cística^{45,49}.

Mycobacterium smegmatis

É uma micobactéria saprófita de crescimento rápido, muito utilizada na área de investigação da tuberculose⁴⁹. Esta bactéria é classificada como um agente de nível biológico 2 (S2) podendo ser manipulada mais facilmente que o *M. tuberculosis* (agente biológico de nível 3)⁴⁹. Apesar de geneticamente diferentes estas duas micobactérias partilham genes importantes para a virulência e patogenicidade do *M. tuberculosis*. Como por exemplo alguns factores transcripcionais e os seus reguladores (factor sigma), bem como os sistemas de dois componentes envolvidos na latência^{34,38,62}.

Esta micobactéria raramente é agente etiológico de doenças pulmonares ou outras infecções não respiratórias (p.e. linfadenite e osteomielite)⁴⁹.

Mycobacterium fortuitum

É uma micobactéria saprófita de crescimento rápido isolada em amostras de água e solo em todo o mundo. Pode formar biofilmes, principalmente em canalizações, levando à libertação de grandes quantidades de microrganismos que infectam as populações que consomem a água contaminada⁴⁶.

Está frequentemente associada a infecções cutâneas e infecções pós cirúrgicas^{46,49}.

Mycobacterium abscessus

Foi reconhecida como espécie em 1992³⁶. É uma micobactéria de crescimento rápido, presente principalmente em amostras de água canalizada e solo⁴⁹.

Provoca infecções na pele e tecidos moles, sendo a segunda MNT mais frequente em doentes com fibrose cística que contraem infecções respiratórias, logo a seguir ao *M. avium*. Entre as micobactérias de crescimento rápido é responsável por, aproximadamente, 80% dos casos^{45,49}.

A infecção com esta micobactéria pode ocorrer após administração de injectáveis. Também pode ser causadora de infecções pós-operatórias^{49,63}.

1.3. Interação Micobactéria-Hospedeiro

Aquando da inalação de bacilos infecciosos estes direccionam-se para os pulmões, onde serão fagocitados pelos macrófagos alveolares, as primeiras células do sistema imunitário com que entram em contacto^{19,40,58}.

Os macrófagos são monócitos que se diferenciam e migram para diferentes locais e tecidos do organismo, onde poderão ser recrutados para uma resposta imunitária¹⁹. Como tal integram a primeira linha de defesa fazendo parte da resposta imunitária inata do organismo.

Após a internalização da micobactéria ocorrem vários processos de defesa em simultâneo. O fagossoma bacteriano vai maturar seguindo um processo sequencial de interacção, fusão e fissão, com componentes da via endocítica. Inicialmente interage com os endossomas precoces, depois com endossomas tardios e termina na fusão com um lisossoma, criando um ambiente hostil capaz de eliminar as bactérias⁵⁰. Estas serão expostas a um pH ácido (inferior a 5), a espécies reactivas de oxigénio, intermediários de azoto e a enzimas lisossomais. Paralelamente, os macrófagos infectados desencadeiam uma resposta pró-inflamatória localizada com a produção de mediadores, como TNF- α e IL-1 β .

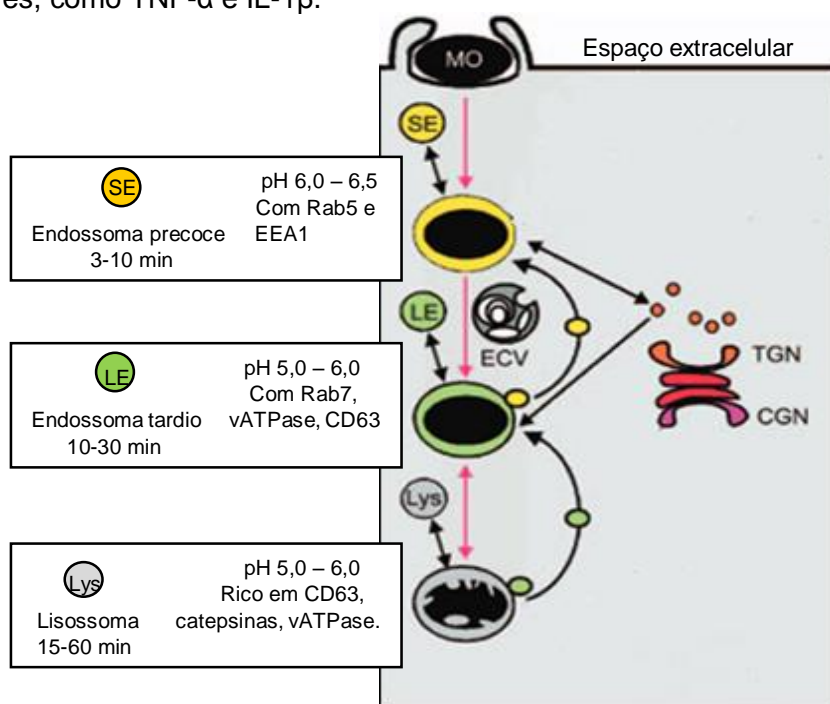


Figura 1. Esquema simplificado da via endocítica (fagocitose). Os tempos indicam, aproximadamente, os períodos de tempo requeridos para uma molécula aparecer no respectivo compartimento (os tempos podem variar consoante o tipo de macrófagos e o estado de activação). CGN, cis Golgi network; EEA1, antígeno de endossoma precoce 1; LE, endossomas tardios; MO, microrganismo; SE, endossomas precoces; TGN, trans Golgi network. Imagem e legenda adaptadas de Albert Haas, 2007²⁰

1.4. O sistema imunitário e a persistência das micobactérias

1.4.1 Produção de agentes oxidativos.

A fagocitose dum agente patogénico pelos macrófagos desencadeia de imediato a resposta imunitária não específica. Um dos primeiros mecanismos microbicidas é a libertação de radicais livres de oxigénio, como o peróxido de hidrogénio, e de azoto (RNIs), como o óxido nítrico (NO) produzido pela sintetase indutível de óxido nítrico (iNOS)³².

Os radicais livres de oxigénio são pouco relevantes na morte das micobactérias, pois estas possuem mecanismos de destoxificação envolvendo enzimas, como a superóxido dismutase e a catalase, que neutralizam os radicais de oxigénio. Desta forma as micobactérias não são expostas aos efeitos nocivos destes radicais, por exemplo a nível do ADN⁵³. Já os RNI estão descritos na literatura como tendo um papel importante na eliminação das micobactérias, pois a sua eficácia é potenciada pela acidificação do fagossoma^{32,50}.

Os relatos na literatura são controversos quanto à acção microbicida do NO. Vários estudos apresentam a libertação de NO como um dos primeiros mecanismos de defesa, ainda que não constitua o principal mecanismo microbicida. Alguns estudos demonstraram que certas micobactérias são susceptíveis ao NO, contudo vários estudos mostraram que várias estirpes patogénicas de micobactéria são resistentes³².

1.4.2 Maturação e acidificação do fagossoma.

O fagossoma formado após a fagocitose irá maturar através de interacções com vários endossomas, por eventos de fusão e fissão¹⁰. Este processo é caracterizado pela alteração da composição da membrana do fagossoma, do conteúdo do lúmen, da produção de proteases e compostos oxidativos tóxicos⁵².

A família das Rab GTP-ases desempenha um papel crucial na maturação do fagossoma. As Rab5 e Rab7 são aquelas que estão presentes nos endossomas precoces e tardios, respectivamente, e que permitem as fusões com os vários componentes da via endocítica. Numa fase precoce o fagossoma irá apresentar Rab5, receptores de transferrina, antígeno de endossoma precoce 1, baixa carga de proteases e um pH ainda pouco ácido (≈ 6)^{32,50}. Com os eventos de fusão e fissão seguintes os fagossomas adquirem novas moléculas e reciclam outras, formando um fagossoma tardio, caracterizado pelo desaparecimento de Rab5 e aparecimento da Rab7 e ácido lisobisfosfatídico (LBPA). A Rab7 permite a fusão do fagossoma com o lisossoma, que evolui para fagolisossoma adquirindo as moléculas características dos lisossomas, como catepsina D e proteína membrana associada a lisossomas 1 (LAMP 1), e um pH ácido (< 5)^{32,50}. A aquisição de bombas de prótons v-ATPase durante o processo de maturação permite a acidificação dos fagossomas^{47,50,53}.

No entanto, é crucial para as micobactérias patogénicas, como o *M. tuberculosis* e *M. avium*, interferir com a maturação do fagossoma bloqueando a biogénese do fagolisossoma, permitindo a sobrevivência das mesmas. Alguns estudos têm mostrado que o pH dos fagossomas de micobactérias patogénicas não é tão ácido devido à deficiente aquisição de v-ATPases^{47,50,53}. Estes fagossomas apresentam também uma composição membrana mais próxima da dos endossomas precoces, com

a presença de Rab5 e ausência de Rab7 e LAMP-1. Tal poderá indicar que as micobactérias apresentam a capacidade de bloquear o processo de maturação do fagossoma numa etapa compreendida entre a perda de Rab5 e a aquisição de Rab7³².

Ainda não é conhecido o momento exacto ou como as micobactérias bloqueiam a maturação do fagossoma. Vários estudos apresentam diversas evidências de que a actividade das micobactérias interfere com as vias de sinalização do hospedeiro, evitando que moléculas necessárias à maturação e acidificação dos fagossomas sigam o seu percurso normal²⁵, criando um ambiente favorável para a sobrevivência no hospedeiro.

1.4.3 Autofagia

A autofagia é um processo celular que permite à célula a ingestão e digestão dos seus organelos e proteínas citoplasmáticas, bem como de agentes patogénicos intracelulares, através da formação de autofagossomas. Estes fundir-se-ão com lisossomas (autolisossoma) levando assim à degradação do seu conteúdo por vários processos. Este é um processo importante na manutenção da homeostasia celular^{8,16,32,47}.

Já foi demonstrado que a autofagia é capaz de eliminar *M. tuberculosis*, e foram já identificadas várias moléculas chave neste processo, importantes no controlo das infecções por micobactérias^{16,32}.

O papel da autofagia na imunidade inata na resposta a infecções microbianas é relevante, mas é ainda necessário elucidar os mecanismos moleculares envolvidos neste processo^{16,32}.

1.4.4 Morte celular: Apoptose e Necrose.

A indução de morte celular durante a infecção com agentes patogénicos pode ser uma componente da resposta imunitária. A morte celular tanto pode ter uma acção benéfica para o organismo, através da apoptose, como uma acção nefasta através da necrose.

A apoptose é uma morte celular programada, que tem um papel muito importante no desenvolvimento embrionário, na formação e crescimento de tumores e na resposta imunitária. É caracterizada por várias alterações morfológicas e biológicas na célula, tais como a alteração da composição da membrana (p.e. a distribuição dos fosfolípidos da membrana alteram, passando a fosfatidilserina a estar na membrana externa da célula), a alteração do potencial de membrana das mitocôndrias, a activação de caspases (p.e. caspases 3, 7 e 8), a fragmentação do ADN e a formação de corpos apoptóticos, sem desencadear uma resposta inflamatória^{4,12}.

Este mecanismo como resposta imunitária inata facilita a morte dos agentes patogénicos, promove a apresentação de antígenos e potencia a actividade microbicida dos macrófagos, restringindo a infecção e o crescimento bacteriano^{2,32}.

A necrose contrariamente à apoptose vai desencadear uma resposta inflamatória pois ocorre um aumento do tamanho celular terminando com a lise celular, e consequente libertação do seu conteúdo no espaço extracelular⁸. Este mecanismo facilita a sobrevivência dos agentes patogénicos ao possibilitar a sua disseminação pelos tecidos vizinhos³².

Vários estudos mostram que as estirpes mais virulentas de micobactérias induzem necrose (p. e. algumas estirpes de *M. tuberculosis*)^{7,32,40,41}. Já estirpes menos virulentas, como o *M. avium*, induzem preferencialmente a apoptose permitindo a sua eliminação em indivíduos imunocompetentes^{2,5,15}.

1.4.5 A produção de citocinas

A produção de citocinas é um mecanismo da resposta imunitária que permite não só recrutar outras células do sistema imunitário como induzir a apoptose, um processo importante na eliminação dos agentes patogénicos.

O factor de necrose tumoral alfa (TNF- α) é uma das citocinas mais importantes na indução da apoptose nas infecções por micobactérias. Esta citocina activa a caspase 8, que é capaz de clivar e activar as caspases efectoras 3 e 7, o que pode ser o suficiente para desencadear a apoptose⁸.

No entanto, algumas micobactérias apresentam a capacidade de inibir esta via ao induzirem a produção do receptor do factor de necrose tumoral 2, que se liga ao TNF- α diminuindo a sua actividade. Esta inibição é medida por outra citocina, a IL-10³².

Vários estudos demonstram que o *M. avium* induz a produção nos macrófagos não só de TNF- α mas também do seu antagonista IL-10².

1.5. Objectivos deste trabalho

O presente estudo teve como objectivos, primeiramente avaliar a sobrevivência de várias MNTs de crescimento lento e rápido no interior de células THP-1 diferenciadas com ésteres de forbol, como modelo dos macrófagos alveolares humanos.

E seguidamente a avaliação de alguns dos mecanismos principais (p.e. morte celular) desencadeados na resposta imunitária inata durante a infecção por MNTs. Tentando-se, desta forma, compreender melhor a interacção destas micobactérias com o hospedeiro, que é fundamental para o desenvolvimento de terapêuticas mais eficazes contra as MNTs.

2. MÉTODOS E MATERIAIS

2.1. Cultura de Micobactérias.

Neste estudo foram utilizadas três estirpes de referência de MNTs (*M. smegmatis* mc²155, *M. fortuitum* ATCC 6841 e *M. avium* ATCC 25291) e três isolados clínicos (*M. abscessus* 549/08, *M. fortuitum* 747/08 e *M. avium* 60/08). Doravante as seguintes designações serão utilizadas: *M. smegmatis* mc²155 – *M. smegmatis*; *M. fortuitum* ATCC 6841 – *M. fortuitum*; *M. fortuitum* 747/08 – 747/08; *M. abscessus* 549/08 – 549/08; *M. avium* ATCC 25291 – *M. avium*; *M. avium* 60/08 – 60/08.

As MNTs foram cultivadas em Middelbrook 7H9 (Difco) suplementado com 10% OADC (oleato albumina dextrose catálase) (Becton and Dickinson) e 0,05% de Tween 80 (Sigma) até ser atingida a fase de crescimento exponencial, numa estufa a 37°C com agitação (200 rpm). Para as MNTs de crescimento rápido a fase exponencial foi atingida em aproximadamente 12h e para as MNTs de crescimento lento em 10 dias.

Foram preparados stocks de todas as MNTs, excepto de 747/08, que foram conservados a -80°C. Para tal, as culturas foram centrifugadas a 1100 g durante 10 minutos, lavadas com PBS, homogeneizadas por agitação em vortex e sonicação durante 15 minutos num banho de ultrassons com uma potência de 80 W (Elma S30. Elmasonic). Finalmente foram ressuspensas numa solução a 50% de glicerol (Sigma) em PBS. A ausência de agregados foi verificada por observação ao microscópio óptico (Axiovert, Zeiss).

2.2. Marcação de MNTs com um composto fluorescente.

As culturas de MNTs foram centrifugadas como descrito anteriormente, lavadas com uma solução de Tween 80 a 0,05% em PBS (PBS/Tween) e marcadas com Oregon Green (OG) (Molecular Probes). Para tal, uma suspensão microbiana foi incubada numa solução a 100 µg/ml de OG em PBS/Tween durante 20 minutos a 4°C com agitação (300rpm) no vortex (Stuart). As MNTs foram depois centrifugadas e lavadas duas vezes com PBS/Tween, homogeneizadas como descrito anteriormente e ressuspensas em PBS: Glicerol (1:1) com uma OD_{600nm} ≈ 1 e conservadas a -80°C.

2.3. Cultura de células.

Neste estudo foi utilizada a linha celular monocítica humana THP-1 (ATCC® TIB-202), cultivada e preservada de acordo com as recomendações do fabricante.

Sempre que foi necessário iniciar uma nova cultura as células foram removidas do azoto líquido, rapidamente centrifugadas a 300 g durante 5 min, e mantidas em meio de cultura celular AB+ (tabela suplementar 1) numa estufa a 37°C com uma atmosfera

de 5% de CO₂ (Binder). As células foram subcultivadas a cada 2-3 dias tendo sido utilizada uma concentração inicial de 1x10⁵ células/ml.

2.4. Indução da diferenciação das células THP-1 com ésteres de forbol.

A diferenciação celular foi induzida com uma solução a 100 nM de 12- miristato 13-acetato de forbol (PMA - Sigma) em meio de cultura celular AB+ durante 3 dias a 37°C numa atmosfera de 5% de CO₂. Decorrido este tempo o meio foi substituído por meio de cultura celular AB+ tendo as células sido incubadas durante mais um dia nas mesmas condições.

2.5. Infecção de macrófagos alveolares com MNTs.

2.5.1. Preparação dos inóculos micobacterianos.

Os inóculos foram preparados por diluição em meio de cultura celular AB- (tabela suplementar 1) dos stocks conservados a -80°C de forma a obter uma OD_{600nm}≈0,1, excepto para o 747/08. Neste caso, foi efetuada uma cultura como descrito anteriormente para cada experiência. A cultura foi centrifugada (1100 g durante 10 minutos) tendo o sedimento sido ressuscitado em meio de cultura de forma a obter a densidade óptica acima indicada.

2.5.2. Tempos de infecção.

Foram plaqueadas 4x10⁴ células por poço numa placa de cultura celular com 96 poços (Orange) e diferenciadas como descrito em 2.4. No dia da experiência o meio de cultura foi removido, tendo sido adicionado por poço 200 µl de inóculo micobacteriano. O tempo de infecção, definido como o período de tempo durante o qual os macrófagos puderam fagocitar as MNTs, foi de 1 ou 3h para as MNTs de crescimento rápido e lento, respectivamente. Decorrido este tempo o meio foi removido, as células foram lavadas uma vez com PBS e adicionado meio de cultura celular AB- suplementado com 10 µg/ml de gentamicina (Gibco), ambos pré-aquecidos a 37°C.

2.6. Aferição do inóculo inicial.

Para cada inóculo inicial foram realizadas diluições sucessivas, em água destilada estéril, quatro vezes com um factor de diluição de 10 vezes. Dez microlitros da última diluição realizada foram plaqueados pelo método de sementeira por espalhamento e dez microlitros de cada diluição pelo método de sementeira em gota, em placas de Muller-Hinton Simples (Oxoid) (MNTs de crescimento rápido) ou 7H10 suplementado com 10% OADC (MNTs lentas). As placas foram incubadas a 37°C até serem visíveis unidades formadoras de colónias (UFC) que foram enumeradas.

2.7. Persistência das micobactérias em macrófagos alveolares.

A persistência intracelular das MNTs de crescimento rápido foi avaliada ao fim de 1, 4, 8 e 24 horas. Para as MNTs de crescimento lento foi avaliada decorridas 3h, 1, 3, 5 e 7 dias.

No final de cada tempo foi removido o meio de cultura, as células foram lavadas duas vezes com PBS pré-aquecido a 37°C e lisadas com 50 µl duma solução aquosa de igepal a 1% (Sigma). A lise foi efetuada durante 5 minutos a 37°C. O lisado resultante foi homogeneizado por pipetagens sucessivas e diluído em água destilada estéril quatro vezes com um factor de diluição de 10 vezes entre diluições consecutivas. Dez microlitros de cada diluição foram plaqueados, pelo método de sementeira em gota, como descrito anteriormente. Este ensaio foi realizado em duplicado.

2.8. Caracterização do fagossoma micobacteriano.

Nestes ensaios foram utilizadas caixas de cultura celular de 24 poços (Orange). Em cada poço foi colocada uma lamela de vidro previamente esterilizada e foram plaqueadas 3×10^5 células que foram diferenciadas e infectadas com MNTs marcadas com OG, como descrito anteriormente.

2.8.1. Acidificação dos fagossomas.

A acidificação do fagossoma de MNTs de crescimento rápido foi avaliada ao fim de 1, 4, 8 e 24 horas; e 3, 8, 24 e 72 horas para MNTs de crescimento lento através dum ensaio com LysoTracker red (Molecular Probes). Para tal uma solução de LysoTracker em meio de cultura celular AB- (1:2500 v/v) aquecida a 37°C foi incubada 30 minutos antes do tempo desejado, à cultura infectada com MNTs de forma a obter uma diluição final de 1:5000. As culturas foram incubadas durante 30 minutos a 37°C numa atmosfera com 5% de CO₂. O meio foi removido, as lamelas foram transferidas para uma caixa de cultura de 24 poços, lavadas com PBS e fixadas com uma solução de para-formaldeído a 4% (PFA 4%) (Merck) durante 15 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. O fixador foi removido, as células foram lavadas com PBS, tendo sido montadas por inversão das lamelas sobre uma gota de meio de montagem para fluorescência (Dako) previamente colocada numa lâmina. As amostras foram conservadas a 4°C ao abrigo da luz até serem observadas no microscópio confocal (Leica Sp2) sob uma objectiva de imersão de 63x. Esta experiência foi realizada em duplicado.

2.8.2. Aquisição de marcadores tardios da maturação do fagossoma.

Neste ensaio foram utilizados anticorpos que reconhecem proteínas específicas: Rab7 (coelho anti-humano Santa Cruz technology), Rab9 (coelho anti-humano Santa

Cruz technology) e CD63 (ratinho anti-humano Peliccluster). A aquisição destes marcadores pelo fagossoma micobacteriano foi avaliada ao fim de 4, 8 e 24h. O ensaio foi realizado em duplicado.

Após fixação as lamelas foram conservadas em PBS a 4°C ao abrigo da luz até ser efetuada a marcação para imunofluorescência. De forma muito breve, as preparações foram permeabilizadas durante 5 minutos com uma solução de Triton X-100 a 0,1% (Sigma), lavadas duas vezes com PBS e incubadas durante 20 minutos numa solução de albumina bovina fracção V (Merck) a 3% em PBS (solução de bloqueio). De seguida, as preparações foram incubadas em 50 µl duma solução de anticorpo anti-CD63 (humano gerado em ratinho) a 5 µg/ml durante 20 minutos a 37°C em atmosfera húmida, lavadas duas vezes com PBS e incubadas em 50 µl anticorpo secundário anti-ratinho Alexa647 (Molecular Probes), diluído 1:1000 em solução de bloqueio, a 37°C durante 20 minutos em atmosfera húmida ao abrigo da luz. As preparações foram lavadas duas vezes em PBS e transferidas para gotas de anticorpo anti-Rab7 ou anti-Rab9 (humano gerado em coelho) a 5 µg/ml e tratadas como descrito anteriormente para o CD63 com a diferença que foi usado um anticorpo anti-coelho marcado com Alexa 548 como anticorpo secundário.

Uma vez lavadas as lamelas foram montadas e conservadas como descrito em 2.7.1 até serem observadas ao microscópio confocal.

2.9. Crescimento das micobactérias a diferentes pHs.

O crescimento das MNTs a pH 6,7, 5,4 e 4,6 foi avaliado num Bactec MGIT960 (Becton and Dickinson) durante 45 dias, com leituras diárias de fluorescência. Ao meio foram adicionados, assepticamente, diferentes volumes de HCl 1M (Panreac), de forma a obter os diferentes pHs. O ensaio foi realizado em duplicado.

A partir de culturas de MNTs em fase exponencial foram preparados inóculos numa concentração de 10^5 micobactérias/ml, como descrito anteriormente. Cada tubo de MGIT suplementado com 10% OADC foi inoculado com 10^4 micobactérias/ml e incubado no Bactec MGIT960. Como controlo de esterilidade foram usados tubo de MGIT com vários pHs testados não inoculados.

Para a avaliação do crescimento a pH 6,7 dos *M. fortuitum*, foram preparados os inóculos como acima descrito. Cinco mililitros de meio de cultura (tabela suplementar 1) por tubo foram inoculados com 10^4 micobactérias/ml e incubados a 37°C durante um período de 5 dias. Diariamente a suspensão foi homogeneizada por agitação no vortex e retirados 20 µl, diluídos sucessivamente em água destilada estéril seis vezes com um factor de diluição de 10 vezes. Entre diluições sucessivas dez microlitros das últimas

quatro diluições foram plaqueadas em Muller-Hinton simples e incubadas como descrito em 2.6 até serem visíveis UFC que foram enumeradas.

2.10. Produção de mediadores da resposta inflamatória.

Nestes ensaios foram utilizadas caixas de cultura celular com 96 poços (Orange). As experiências foram efectuadas como descrito em 2.5.2. Quando decorridos os tempos avaliados em 2.6, os sobrenadantes foram recolhidos e conservados a -20°C.

2.10.1. Avaliação da produção de IL-10.

A quantificação da produção de IL-10 foi efectuada por uma técnica de ELISA, utilizando o kit Human IL-10 Elisa Ready-Set-Go (eBioscience) de acordo com as especificações do fabricante. Como controlo negativo foram utilizados sobrenadantes de células não infectadas. As leituras foram efectuadas num leitor de placas (Spectra max 340 PC, Molecular Devices) a 450 e 540 nm

2.10.2. Avaliação da produção de NO.

A quantificação de NO foi realizada por um método colorimétrico baseado na reacção de Griess (Sigma). De forma breve, foi efectuada uma curva de calibração com soluções de nitrito de sódio (Sigma) em meio de cultura celular AB- com concentrações compreendidas entre 3 e 90 µM. O meio de cultura celular AB- foi utilizado como controlo negativo. Células estimuladas com 100 UI de INF-gama (Immunotools) e 20 ng/ml de lipopolissacarídeos (LPS) de *Klebsiella pneumoniae* (Sigma) durante, aproximadamente, 20h foram usadas como controlo positivo. Os controlos (positivo e negativo), as soluções de calibração e as amostras foram diluídas de 1:1 (v/v) com a solução de reagente de Griess numa placa de 96 poços e incubados durante 5 minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz. A absorvância das soluções foi lida a um comprimento de onda de 554 nm num espectrofotómetro com leitor de placas. As concentrações de NO foram calculadas através da curva de calibração. Os limites de detecção e quantificação do método foram determinados experimentalmente através da determinação da razão sinal/ruído. O limite de quantificação foi estabelecido para um valor da razão sinal/ ruído maior ou igual a 10, enquanto que para a detecção foi estabelecido para um valor da mesma razão igual ou superior a 2.

2.11. Morte celular.

A indução de apoptose e necrose foi estudada em apenas 3 das MNTs em estudo: *M. smegmatis*, eliminado em 24h; 747/08 e 60/08, ambos capazes de permanecer e crescer no interior dos macrófagos. Para a avaliação da indução de

apoptose foram realizados ensaios para a detecção de marcadores apoptóticos. Os ensaios foram realizados em duplicado.

A anexina-V, que apresenta uma elevada afinidade para a fosfatidilserina na membrana exterior da célula, foi avaliada ao fim de 30 min, 1, 5 e 24 horas para as MNTs de crescimento rápido e 1, 3, 8 e 24 horas para a de crescimento lento. Neste ensaio foram utilizadas caixas de cultura celular de 6 poços (Orange), onde foram plaqueadas $1,2 \times 10^6$ células que foram diferenciadas e infectadas com MNTs marcadas com OG, como descrito anteriormente.

De uma forma muito breve, o meio com inóculo foi removido, as células lavadas duas vezes com PBS e soltas com um raspador em PBS. Foram transferidas para tubos de citometria (Falcon) (idealmente 1×10^6 células) e centrifugadas a 300g durante 5 minutos. Ressuspenderam-se as células em 100 µl de tampão de ligação e adicionou-se 5 µl de anexina-V e 7-AAD (Becton and Dickinson) incubando à temperatura ambiente e ao abrigo da luz durante 15 minutos. Terminado o tempo, adicionou-se 500 µl de tampão de ligação. As amostras foram colocadas em gelo até a sua leitura no citómetro FACS calibur, que foi realizada até 1h após a marcação.

Foram avaliadas duas caspases mediadoras da apoptose: a caspase 8 que foi avaliada ao fim de 15, 30 min, 1, 2, 3 e 4h para todas as MNTs com os tempos adicionais de 8, 24 e 72 horas para o *M. avium*; e as caspases 3 e 7 avaliadas ao fim de 1, 2, 3, 6 e 24 horas para todas as MNTs. Nestes ensaios foram utilizadas caixas de cultura celular de 24 poços. Em cada poço foi colocada uma lamela de vidro previamente esterilizada e foram plaqueadas 3×10^5 células que foram diferenciadas e infectadas com MNTs como descrito anteriormente.

A quantificação das caspases foi realizada por microscopia em células aderentes, utilizando a marcação com o kit Carboxifluoresceína FLICA (Immunochemistry Technologies) de acordo com as especificações do fabricante. As lamelas foram montadas por inversão sobre uma gota de meio de montagem para fluorescência com 1 µl de Hoechst, fornecido no kit, previamente colocada numa lâmina. As amostras foram conservadas como descrito em 2.7.1 até serem observadas no microscópio confocal.

O controlo negativo utilizado nestes ensaios foram células não infectadas, como controlo positivo foi realizada a indução da apoptose e de necrose.

A apoptose foi induzida por um de dois métodos: 1) Incubação sucessiva, a 37°C com 5% CO₂, com 1 µg/ml de LPS de *K. pneumoniae* durante 3h e 3mM de ATP (Sigma) durante 30 minutos, ou 2) incubação com camptotecina (Sigma) 4 µg/ml a 37°C durante 4h. Os resultados obtidos por ambos os métodos foram idênticos.

Como controlo positivo de necrose as células não infectadas foram fixadas com uma solução de PFA a 4% durante 15 minutos, lavadas duas vezes com PBS, incubadas numa solução de cloreto de amónio 50 mM (Sigma) durante 5 minutos à temperatura ambiente, novamente lavadas duas vezes com PBS e permeabilizadas com uma solução de Triton X-100 a 0,1% durante 10 minutos à temperatura ambiente. Após duas lavagens com PBS foram incubadas com 1,25 µg/ml de iodeto de propídeo (Immunochemistry Technologies) à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, durante 5 minutos.

2.12. Análise estatística.

Os resultados apresentados são as médias de pelo menos duas experiências independentes.

Para os dados com uma distribuição normal, a comparação entre grupos foi feita através do teste t de student. Os valores de $p < 0.05(*)$ e $p < 0.01(**)$ foram considerados estatisticamente significativos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Persistência das MNTs num modelo de macrófagos alveolares

Inicialmente procedeu-se à avaliação da persistência de MNTs de crescimento rápido (*M. smegmatis*, os dois *M. fortuitum* e 549/08) e lento (os dois *M. avium*) num modelo celular que mimetiza os macrófagos alveolares. Este modelo, descrito anteriormente^{57,61}, é constituído por células THP-1 diferenciadas por acção dos ésteres de forbol. A escolha recaiu sobre este modelo porque os macrófagos alveolares são as primeiras células a contactarem com as micobactérias durante uma infecção respiratória.

A persistência intracelular das MNTs foi avaliada através da enumeração de unidades formadoras de colónias (UFC) recuperadas dos macrófagos infectados ao longo do tempo (ver métodos e materiais). A multiplicidade de infecção foi igual para todas as micobactérias estudadas. A observação da figura 1 revela que o número de MNTs fagocitadas é contudo distinto. Entre as MNTs de crescimento rápido as estirpes de *M. fortuitum* foram preferencialmente fagocitadas, uma vez que ao fim de 1h de infecção, o número de bactérias internalizadas é superior. Embora não tenha sido contemplado neste estudo, este resultado sugere que poderão estar envolvidos receptores diferentes na fagocitose destas MNTs o que poderá contribuir para o desfecho da infecção^{20,32}.

Os perfis de persistência intracelular são apresentados na figura 2. Estes perfis permitem dividir as MNTs em 3 grupos: as que são eliminadas em 24 h (*M. smegmatis*); as que sobrevivem e se mantêm em latência no interior dos macrófagos (*M. fortuitum*); e as que têm capacidade de permanecer e crescer nos macrófagos (747/08, 549/09 e as duas estirpes de *M. avium*).

O perfil de persistência do *M. smegmatis* (Fig 2.a) obtido é semelhante aos perfis descritos na literatura para esta micobactéria em macrófagos de ratinho J774^{31,44}. Nas duas linhas celulares o *M. smegmatis* apresenta 2 fases de morte (1-4h e 8-24h) intercaladas por uma fase de crescimento entre as 4 e as 8h. Este perfil de persistência difere do observado para esta micobactéria em macrófagos humanos obtidos por diferenciação de monócitos do sangue periférico³¹. Nestas células o *M. smegmatis* é eliminado numa forma contínua. Estes resultados demonstram que tanto o hospedeiro como o tipo de células utilizadas são cruciais para o desenlace da infecção.

No caso de *M. fortuitum* a micobactéria apresenta um perfil de latência, aparentemente em discordância com o descrito na literatura nesta linha celular²² mas semelhante ao observado em macrófagos peritoniais de ratinho⁴². Contudo, a indução de diferenciação de células THP-1, a MOI e o tempo de infecção são distintos dos

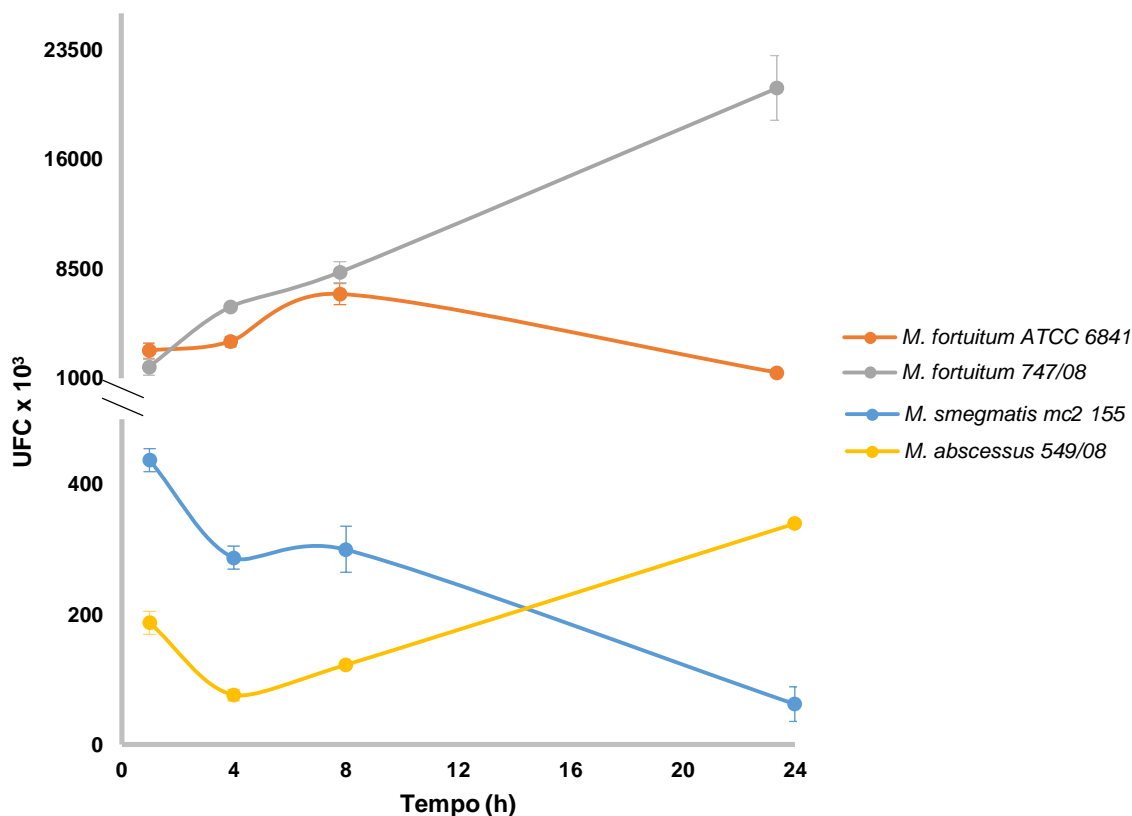
utilizados neste estudo. Uma vez que o inóculo inicial tem um papel crucial no desfecho das infecções por micobactérias isto pode explicar a obtenção de resultados distintos⁵⁶.

A estirpe de *M. fortuitum* clínica (747/08) apresenta a capacidade de se replicar no interior dos macrófagos a partir do momento em que os infecta. O 549/08, que apresenta igualmente capacidade de se replicar intracelularmente, regista um decréscimo do número de UFCs durante as primeiras 4h de infecção. Este perfil sugere que o 549/08 necessita de um período inicial de adaptação ao ambiente no interior dos macrófagos. Este fenómeno está de acordo com relatos da literatura embora as experiências tenham sido efetuadas em condições distintas^{22,60}.

As estirpes de *M. avium* apresentam igualmente um perfil de crescimento no interior dos macrófagos. Contudo, à semelhança do 549/08, estas MNTs necessitam dum período de adaptação ao hospedeiro que é diferente para o 60/08 (1 dia) e *M. avium* (3 dias). Os resultados obtidos são concordantes com os descritos na literatura para células de ratinho^{17,29}.

No conjunto os resultados obtidos demonstram que as MNTs, consideradas oportunistas causando doença em indivíduos imunodeprimidos, apresentam a capacidade de infectarem e persistirem em células de um hospedeiro imunocompetente. É importante, por isso, documentar o processo de infecção destas micobactérias.

a)



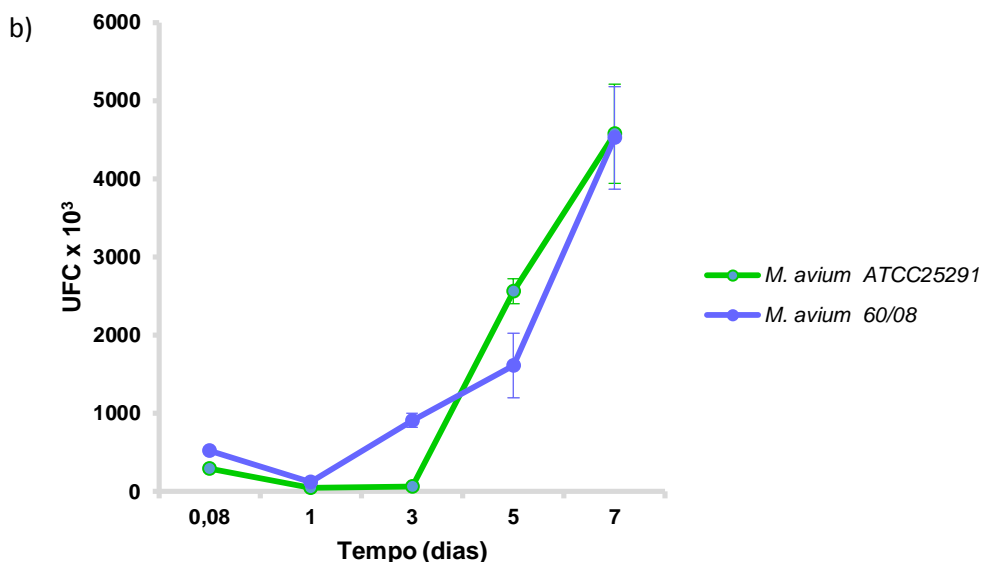


Figura 2. Curvas de sobrevivência das estirpes MNTs.

A persistência intracelular das MNTs de crescimento rápido foi avaliada durante 1 dia (a), enquanto que as de crescimento lento foi avaliada durante 7 dias (b).

3.2. Caracterização do fagossoma micobacteriano

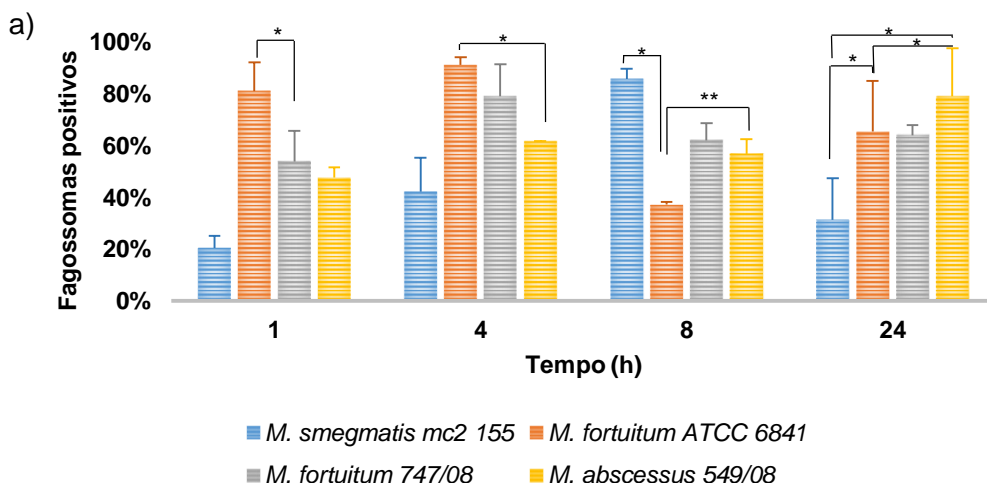
A inibição da maturação do fagossoma micobacteriano é apontada desde os primórdios dos estudos de biologia celular nesta área, como a chave para a persistência intracelular destes microrganismos¹. Estudos mais recentes aceitam mecanismos alternativos como a fuga da micobactéria do fagossoma para o citosol evitando o ambiente hostil presente no interior dos fagolisossomas³². Assim, inicialmente tentámos relacionar a persistência das diferentes MNTs com a acidificação do fagossoma micobacteriano. Tal foi efetuado através da monitorização, por microscopia confocal (fig. 3.c), da aquisição duma substância acidotrópica fluorescente, Lysotracker red, pelos fagossomas bacterianos ao longo do tempo (ver métodos e materiais). Os resultados obtidos são apresentados na figura 3.

Contrariamente ao esperado, devido aos perfis de crescimento obtidos anteriormente e à teoria do bloqueio da fusão fagossoma-lisossoma pelas micobactérias, mais de 50% dos fagossomas contendo MNTs, com excepção do *M. smegmatis*, são acídicos (fig. 3.c). Os compartimentos não acídicos ocupados pelo *M. smegmatis* estão assinalados na figura 3.c com setas brancas e os compartimentos acídicos ocupados por *M. fortuitum* assinalados com setas vermelhas. A acidificação ocorre precocemente (1h) e mantém-se mais ou menos constante até às 24h. No caso do *M. smegmatis* a acidificação ocorre mais lentamente e duma forma progressiva. O valor mais elevado é atingido às 8h (85,9%) coincidido com o início da inversão da curva de sobrevivência (fig 2.a). A partir deste ponto a bactéria é eliminada continuamente

pelos macrófagos. Estes resultados sugerem que a inibição da maturação do fagossoma é crucial para a persistência do *M. smegmatis* nesta linha celular.

As restantes MNTs mantêm valores elevados de fagossomas positivos ao longo de toda a experiência como pode ser observado nas figuras 3.a (MNTs de crescimento rápido) e 3.b (MNTs de crescimento lento). O facto destas micobactérias serem ambientais pode funcionar como elemento diferenciador relativamente ao *M. tuberculosis* que tem como único hospedeiro o Homem e garante a sua persistência nos macrófagos inibindo a maturação do fagossoma. As MNTs para persistirem no ambiente tiveram de se adaptar a condições extremas de pH e temperatura¹⁴. Esta capacidade de adaptação poderá garantir a sobrevivência das MNTs no ambiente hostil do fagolisossoma.

Ao fim de 8h de infecção foi verificada uma diferença significativa entre a percentagem de compartimentos ácidos ocupados pelo *M. fortuitum*, o 549/08, e o *M. avium* com 37%, 56% e 75% de fagossomas positivos, respectivamente. E ao fim de 24h, diferença significativa entre as MNTs de crescimento rápido, excepto com o 747/08, e entre as duas estirpes de *M. avium*, apresentando o isolado clínico uma percentagem de fagossomas positivos menor. É neste momento da infecção que o 60/08 começa a crescer nos macrófagos, contrariamente ao *M. avium* que apenas ao fim de 3 dias de infecção apresenta capacidade de crescimento no interior destas células (fig. 2.b).



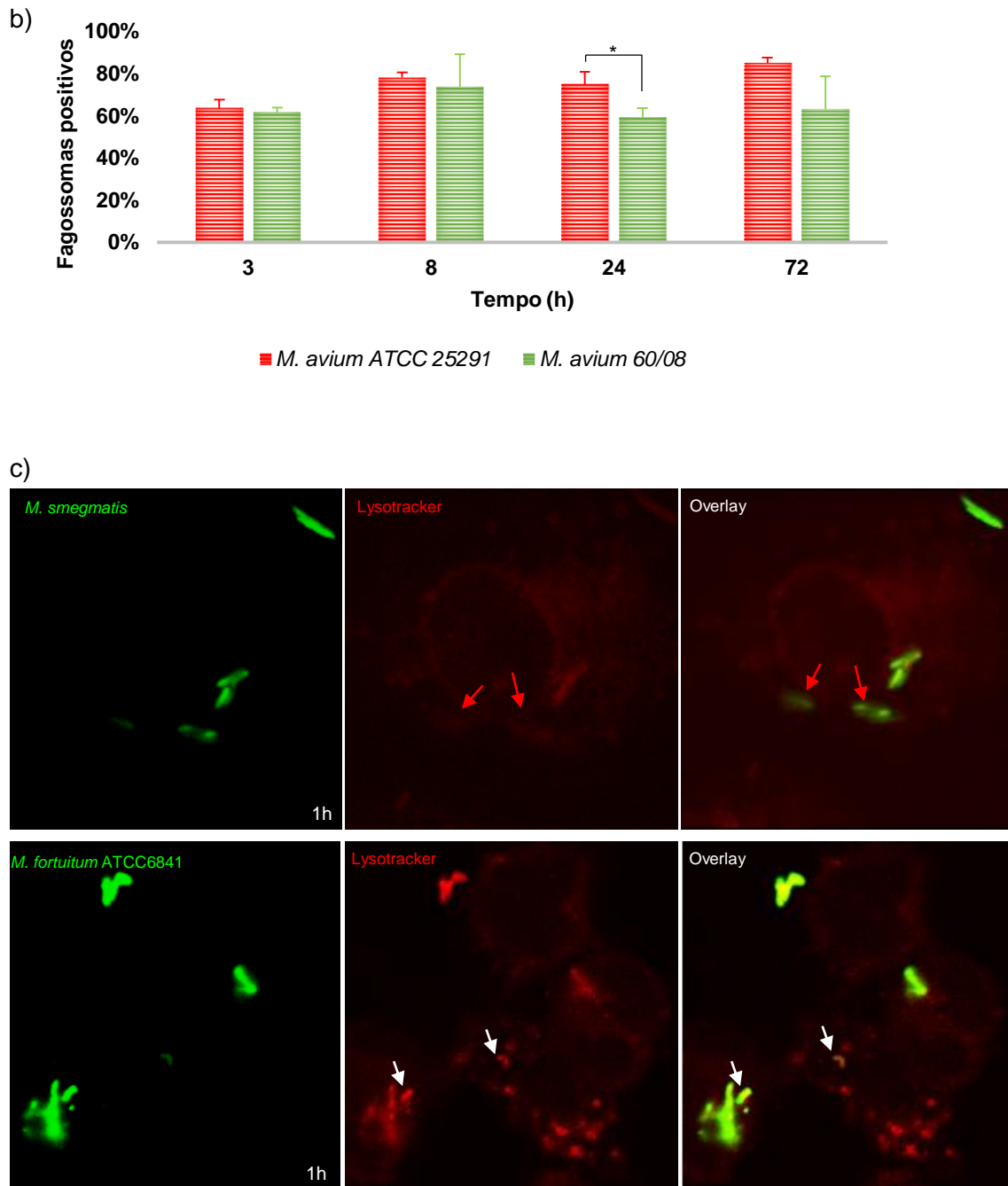


Figura 3. Acidificação dos fagossomas de MNTs.

O perfil de acidificação dos fagossomas de MNTs rápidas (a) e lentas (b) foi seguido ao longo de 24 e 72h, respetivamente. As diferenças entre as percentagens de acidificação dos fagossomas foram consideradas significativas para valores de $p < 0,05$ (*) e $p < 0,01$ (**). Imagens representativas são apresentadas na figura (c). As setas vermelhas indicam compartimentos negativos (micobactéria dentro de compartimentos não acidificados, não marcados por Lysotracker) e as setas brancas indicam os fagossomas positivos (micobactérias dentro de compartimentos ácidos).

A elevada percentagem de acidificação dos fagossomas de MNTs sugere que o bloqueio da maturação do fagossoma será menos eficiente do que o observado para *M. tuberculosis*. Este fagossoma é caracterizado por um pH pouco ácido, pela presença de marcadores precoces (Rab5) e exclusão de marcadores tardios (Rab7). Para testar a hipótese de que a inibição da maturação seria menos eficiente nas MNTs e determinar o ponto da via endocítica em que se encontra o seu fagossoma foram utilizados vários marcadores da via endocítica. Os marcadores de endossomas tardios (Rab7 ou Rab9) e de lisossomas (CD63, uma molécula semelhante à LAMP-1) foram os selecionados. Os resultados obtidos para a aquisição de Rab7 (figura 4.a) e CD63 (figura 4.b) são apresentados na Figura 4.

A Rab7 foi encontrada nos fagossomas de todas as MNTs embora a cinética de aquisição e concentração varie de forma significativa entre as várias estirpes (figura 4.a, c). As variações são mais significativas nos tempos 4h e 8h estando mais atenuadas posteriormente (1 dia). Os perfis de aquisição de Rab7 e de acidificação do fagossoma micobacteriano (fig 3. a-b) são concordantes.

O marcador de lisossomas CD63, embora presente, apresenta valores muito inferiores aos da Rab7 (figura 4.b). Ao contrário do observado para a Rab7 não existem diferenças significativas entre as várias MNTs com excepção da observada entre *M. smegmatis* e *M. avium* às 8h. Esta aquisição diferencial dos dois marcadores, juntamente com a elevada percentagem de fagossomas ácidos, demonstra que o bloqueio da maturação do fagossoma é menos efetivo do que o descrito para *M. tuberculosis*^{35,50}. O fagossoma das MNTs estudadas, com excepção do *M. smegmatis*, adquire rapidamente Rab7 ao contrário do fagossoma de *M. tuberculosis*, mas é capaz de excluir o CD63 não se convertendo num fagolisossoma.

Os resultados apresentados mostram que a maioria destas MNTs não habita num fagossoma com um pH próximo da neutralidade. Assim, a persistência intracelular pode resultar do facto de algumas MNTs serem intrinsecamente resistentes à acção microbicida dos hidrogeniões.

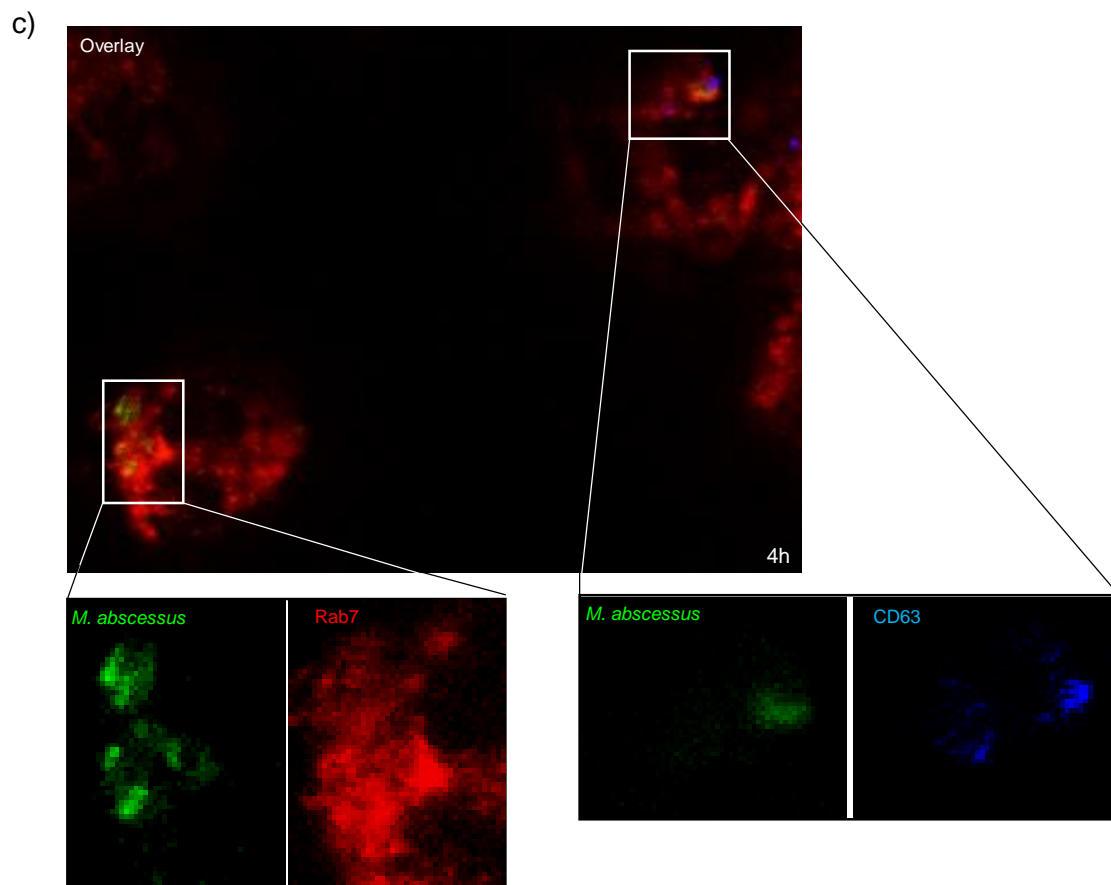
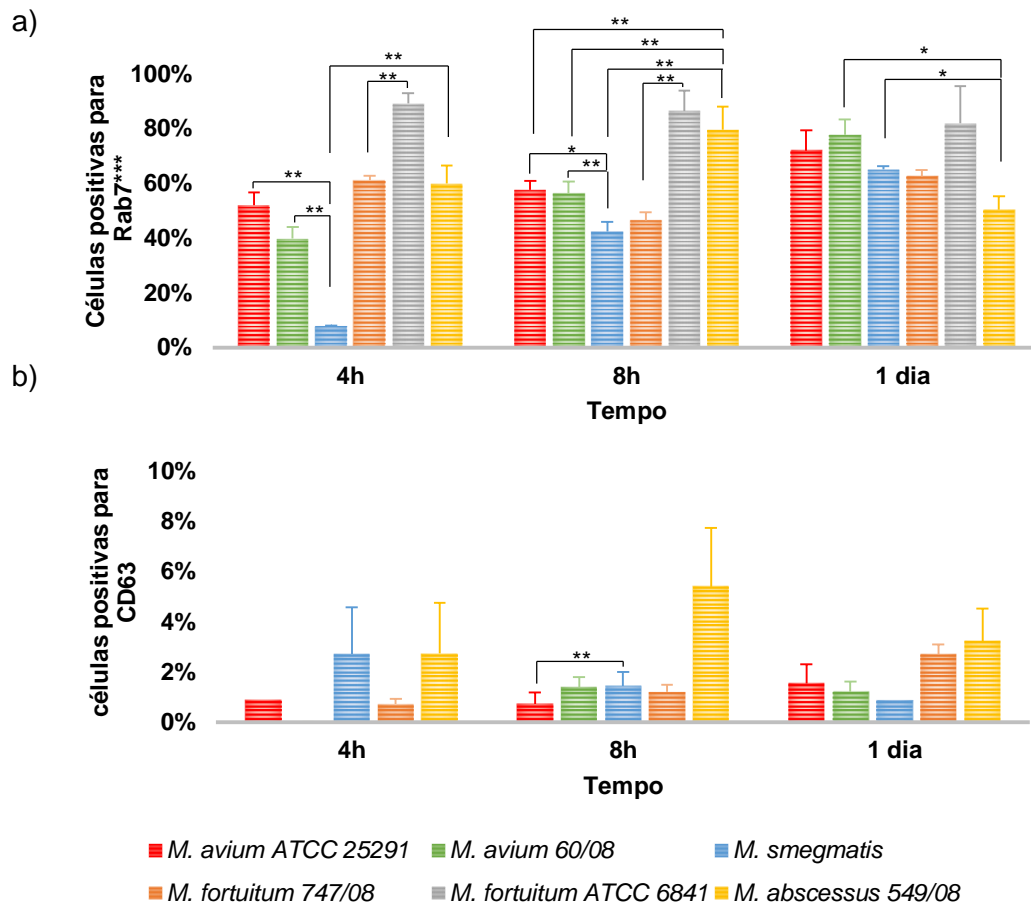


Figura 4. Avaliação de marcadores de endossomas tardios e de lisossomas.

Aquisição de um marcador endossomal tardio, Rab7 (a) e lisossomal, CD63 (b) foi seguida ao longo de 24h. (***) Para as estirpes de *M. fortuitum* foi utilizado Rab9 em vez de Rab7. As diferenças entre as percentagens de aquisição de marcadores foram consideradas significativas para valores de $p < 0,05$ (*) e $p < 0,01$ (**). Imagens representativas são apresentadas na figura (c). Estando em destaque as situações em que os fagossomas são positivos para a Rab7 (canto inferior esquerdo) e para o CD63 (canto superior direito).

3.3. Crescimento das micobactérias a diferentes pHs

À medida que os fagossomas com agentes patogénicos maturam, através da interacção e fusão com endossomas tardios e lisossomas, o seu pH vai alterando (fig.1). Inicialmente o pH é neutro ($\approx 6,3$) e ideal ao crescimento dos agentes. Com o tempo o pH vai diminuindo, ao fundir-se com os endossomas tardios o seu pH já desceu para um valor perto dos 5,5. Quando ocorre a fusão com o lisossoma, o fagolisossoma já apresenta um pH ácido (< 5) ao qual a maioria dos agentes patogénicos não é capaz de sobreviver, ajudando a criar o ambiente hostil a que estes ficam expostos⁵⁰.

Sabendo os vários pHs a que as micobactérias são expostas durante a maturação do fagossoma e que mesmo ocorrendo a maturação existem estirpes capazes de permanecer nas células, foi-se averiguar a susceptibilidade das MNTs a diferentes concentrações hidrogeniónicas.

Os pHs seleccionados para o estudo foram 6,7, 5,4 e 4,6 tendo sido avaliada a actividade metabólica das micobactérias ao longo de 45 dias por um método fluorimétrico (ver métodos e materiais). Foi observado crescimento bacteriano em todas as condições testadas excepto para o *M. smegmatis* a pH 4,6 (Tabela 1). Contudo, foram observadas cinéticas de crescimento distintas para a mesma MNT a diferentes pHs (figura 5. Resultados para todas as MNTs apresentados nos anexos: figura suplementar 1).

Estes resultados demostram que os perfis de crescimento nos macrófagos (fig 2.a-b) e a acidificação dos fagossomas micobacterianos (fig. 3. a-b) não são incompatíveis. Por exemplo, no caso das duas estirpes de *M. avium* a pH 5,4 (\approx pH do lúmen do fagossoma), *in vitro*, verificou-se que o 60/08 começa a crescer antes do *M. avium*, mas que este tem um tempo de geração inferior. O tempo de geração do *M. avium* foi de 3,20 dias enquanto que o do 60/08 foi de 4,79 dias. As cinéticas de crescimento observadas, *in vitro* e *in vivo*, são semelhantes.

As duas estirpes de *M. fortuitum* a pH 6,7 crescem muito rapidamente o que provoca a saturação do sinal de fluorescência ao fim de 24h. Por esse motivo foi

necessário proceder à avaliação do seu crescimento por outro método (enumeração de UFC) (figura suplementar 2).

| pH | MNT | | | | | |
|-----|---------------------|---------------------|--------|--------|-----------------|-------|
| | <i>M. smegmatis</i> | <i>M. fortuitum</i> | 747/08 | 549/08 | <i>M. avium</i> | 60/08 |
| 4,6 | - | + | + | + | + | + |
| 5,4 | + | + | + | + | + | + |
| 6,7 | + | + | + | + | + | + |

Tabela 1. Crescimento a diferentes pHs das estirpes de MNTs em estudo. (+) crescimento; (-) ausência de crescimento.

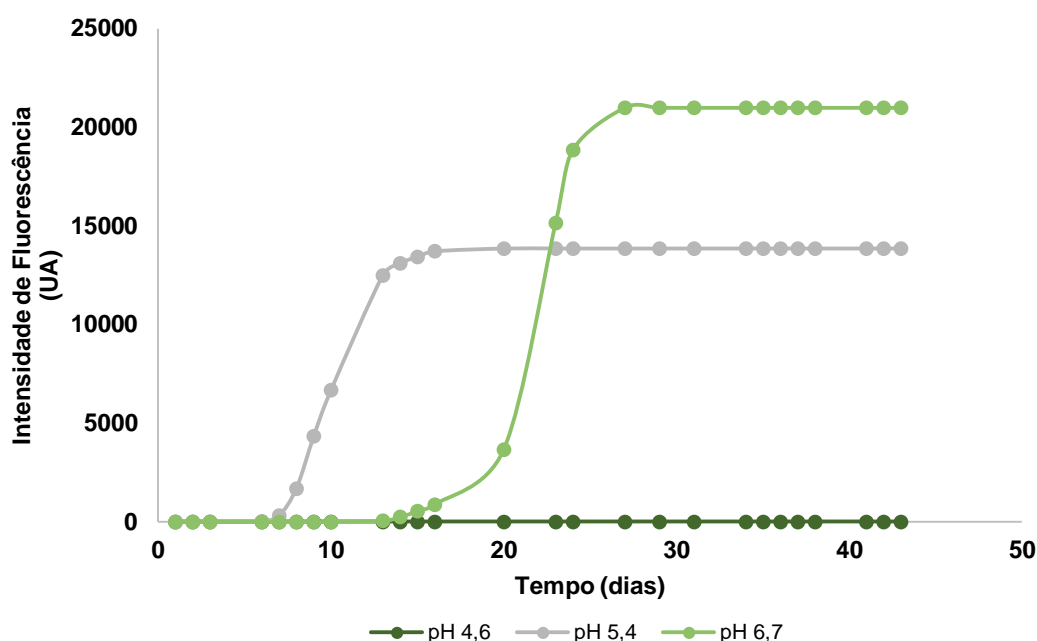


Figura 5. Cinética de crescimento do *M. smegmatis* em diferentes pHs.

3.4. Produção de mediadores da resposta inflamatória

Os resultados apresentados até este ponto demonstram que a maturação do fagossoma micobacteriano é incompleta e ineficaz na eliminação das micobactérias. Para explicar os perfis de persistência intracelular observados foram avaliados outros mediadores da resposta imunitária inata. A nossa escolha recaiu na produção de moléculas pró-inflamatórias (NO) e anti-inflamatórias (IL-10) produzidas pelos macrófagos infectados.

Inicialmente foi avaliada a produção de óxido nítrico (NO), descrito como um dos primeiros mecanismos a ser activado pelos macrófagos após a fagocitose de microrganismos³². O NO foi doseado nos sobrenadantes de culturas de macrófagos infectados ao longo do tempo por um método espectrofotométrico (ver métodos e

materiais). As quantidades de NO induzidas pela infecção por MNT são muito reduzidas ao longo de toda a experiência sendo inferiores ao limite de quantificação do método (9 μM) e mesmo de detecção (1,8 μM). A exceção foi o 60/08 para o qual ao fim de 3 dias de infecção foi detectada em média uma concentração de 50 μM de NO. Estes resultados apontam para a existência duma indução diferencial deste mecanismo de defesa pelas MNTs. Contudo, sugerem também que o papel desempenhado pelo NO na eliminação das MNTs será residual. A realização de testes de susceptibilidade ao NO a diferentes pHs poderia ajudar a elucidar o papel desempenhado por este mediador inflamatório nas infecções por MNTs.

De seguida foi avaliada a produção da citocina anti-inflamatória IL-10. Esta molécula é um antagonista do TNF- α , permitindo às micobactérias evitar a apoptose celular², e uma potente inibidora da actividade microbida dos macrófagos^{2,3}. A quantificação foi realizada em sobrenadantes de macrófagos infectados ao longo do tempo pelo método de ELISA (ver métodos e materiais).

À semelhança do observado para o NO a produção de IL-10 foi detetada apenas nos sobrenadantes das culturas de macrófagos infetadas com 60/08. A citocina é detetada após um dia de infecção (64 pg/ml), atinge o máximo após 3 dias (81 pg/ml) e decai para 29 pg/ml ao fim de 5 dias deixando de ser detectada posteriormente. A janela temporal em que se registam os valores de secreção mais elevada de IL-10 (1 a 3 dias) coincide com um período de replicação intracelular do 60/08 (Figura 2.b), sugerindo um envolvimento na persistência intracelular desta MNT. A realização de ensaios com inibidores desta citocina permitiriam confirmar ou excluir o seu envolvimento neste processo.

O equilíbrio entre a produção de mediadores pró- e anti-inflamatórios é crucial para o desfecho das infecções por MNTs. Contudo, é difícil estabelecer o papel desempenhado por estes mediadores uma vez que a resposta imunitária não é transversal a todos os modelos usados. A produção de NO induzida por *M. smegmatis* é um exemplo desta resposta diferencial. Em macrófagos de ratinho esta MNT induz a produção de NO mas em macrófagos humanos não. No caso da produção de citocinas podem ser encontrados igualmente relatos contraditórios. Contudo, em alguns estudos com macrófagos isolados de pacientes infetados com MNTs foi possível associar a indução diferencial de várias citocinas, IL-10 incluída, por MNTs distintas^{37,54}. Os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com a indução da produção de IL-10 pela estirpe clínica de *M. avium* e ausência da mesma nas outras MNTs, nomeadamente no *M. abscessus*. A concordância entre os resultados dum estudo efetuado com pacientes e num modelo celular valida o uso do mesmo para inferir sobre a resposta imunitária nestas infecções.

3.5. Morte celular dos macrófagos alveolares infectados.

A indução da apoptose tem sido considerada como um mecanismo do sistema imunitário que facilita a eliminação das micobactérias contendo a infecção¹⁵. Contrariamente à indução da necrose que é apontada como um mecanismo de virulência das micobactérias^{7,32}.

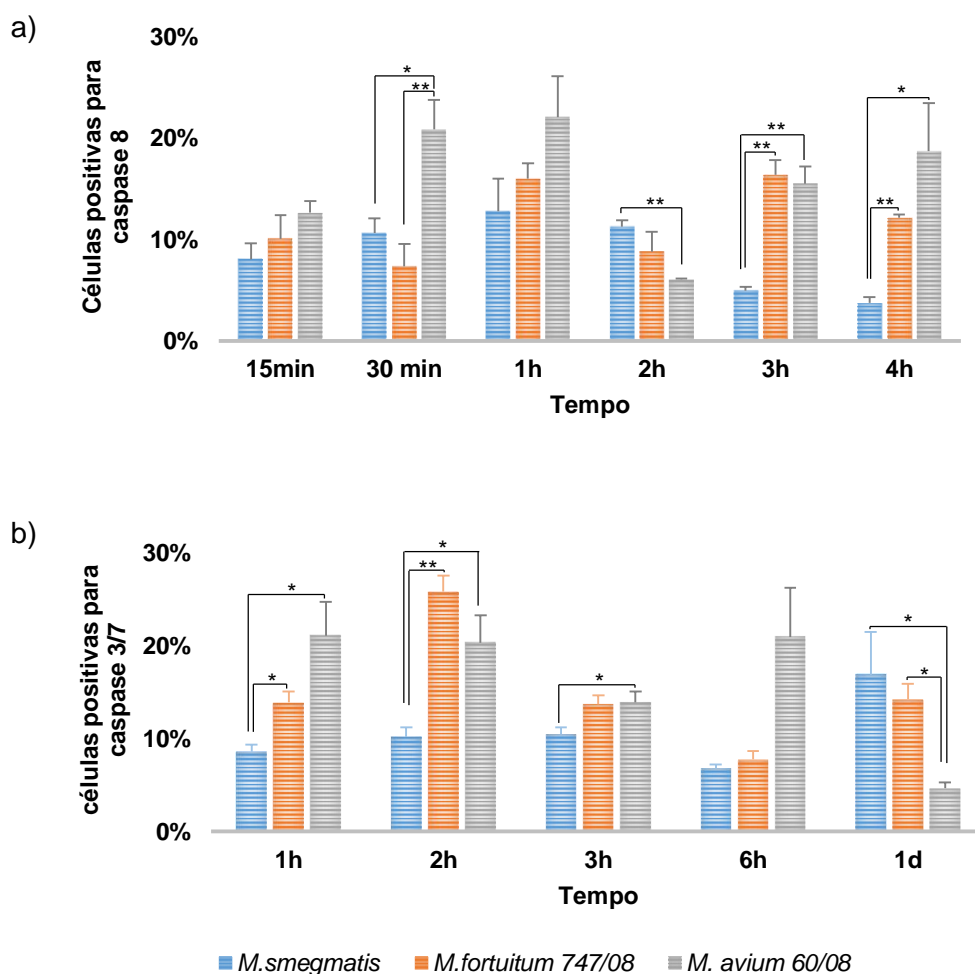
Como tal, o último passo deste trabalho consistiu na avaliação da indução de morte celular durante a infecção por MNTs. Para tal foram seleccionadas 3 MNTs com perfis de persistência intracelular e/ou tempos de replicação distintos. O *M. smegmatis* foi seleccionado para representar as MNTs de crescimento rápido eliminadas pelos macrófagos. Enquanto que o 747/08 e 60/08 foram seleccionados para representar as MNTs de crescimento rápido e lento, respectivamente, que persistem no interior dos macrófagos.

Inicialmente foi avaliada a presença do mediador precoce de apoptose anexina-V, por citometria de fluxo como descrito nos métodos e materiais. Em paralelo, foi monitorizada a indução de necrose celular por aquisição de iodeto de propídeo que apresentou sempre valores residuais (menos de 3%). Os resultados obtidos não foram quantitativamente consistentes nos vários ensaios realizados. Por esta razão optámos por não os apresentar. Contudo, os mesmos refletem a existência duma indução diferencial da apoptose por estas MNTs sendo o 60/08 o indutor mais potente e o *M. smegmatis* o mais fraco. O aparecimento precoce da anexina-V neste processo, juntamente com um período de amostragem inadequado poderão ter contribuído para as variações observadas nos resultados.

As caspases 8 (activadora), 3 e 7 (efectoras) foram os outros mediadores estudados neste trabalho. A análise foi efetuada por microscopia confocal como descrito nos métodos e materiais (figura 6.c). Os resultados obtidos são apresentados na figura 6 e confirmam que a apoptose é um processo desencadeado muito precocemente nestas células (15 minutos figura 6.a). A indução diferencial de apoptose pelas 3 MNTs sugerida pelos resultados da anexina-V foi igualmente confirmada.

O facto da indução da caspase 8 ser significativamente mais elevada nas células infetadas com 747/08 e 60/08 (MNTs capazes de se replicarem nos macrófagos) do que com *M. smegmatis* sugere que a apoptose pode estar relacionada com a persistência intracelular (fig 6.a). À semelhança do que sucedeu com a avaliação da persistência intracelular de 60/08 também a indução da caspase 8 foi avaliada numa escala temporal distinta. Os resultados obtidos ao fim de 8, 24 e 72 h foram de 13,9% \pm 0,33%, 4,24% \pm 0,59% e 9,37% \pm 1,43% o que nos permitiu concluir que o máximo de activação era atingindo após 1h de infecção. Com base nestes resultados foram estabelecidos os tempos de amostragem para as caspases efectoras 3/7.

Os resultados obtidos para a Caspase 3/7 confirmam a tendência observada para a Caspase 8 e a anexina. Contudo, partindo da premissa que a apoptose facilita a eliminação e a necrose promove a persistência das micobactérias, seria de esperar que o *M. smegmatis* fosse um melhor indutor das caspases (1, 2 e 3 horas de infecção. Fig. 6. b). Por sua vez o 60/08 foi a que demonstrou maior indução da apoptose como era esperado, segundo a literatura o *M. avium* é capaz de induzir a apoptose pela activação de várias caspases³. A necrose induzida pelas MNT estudadas foi residual ao longo de todo o estudo.



c)

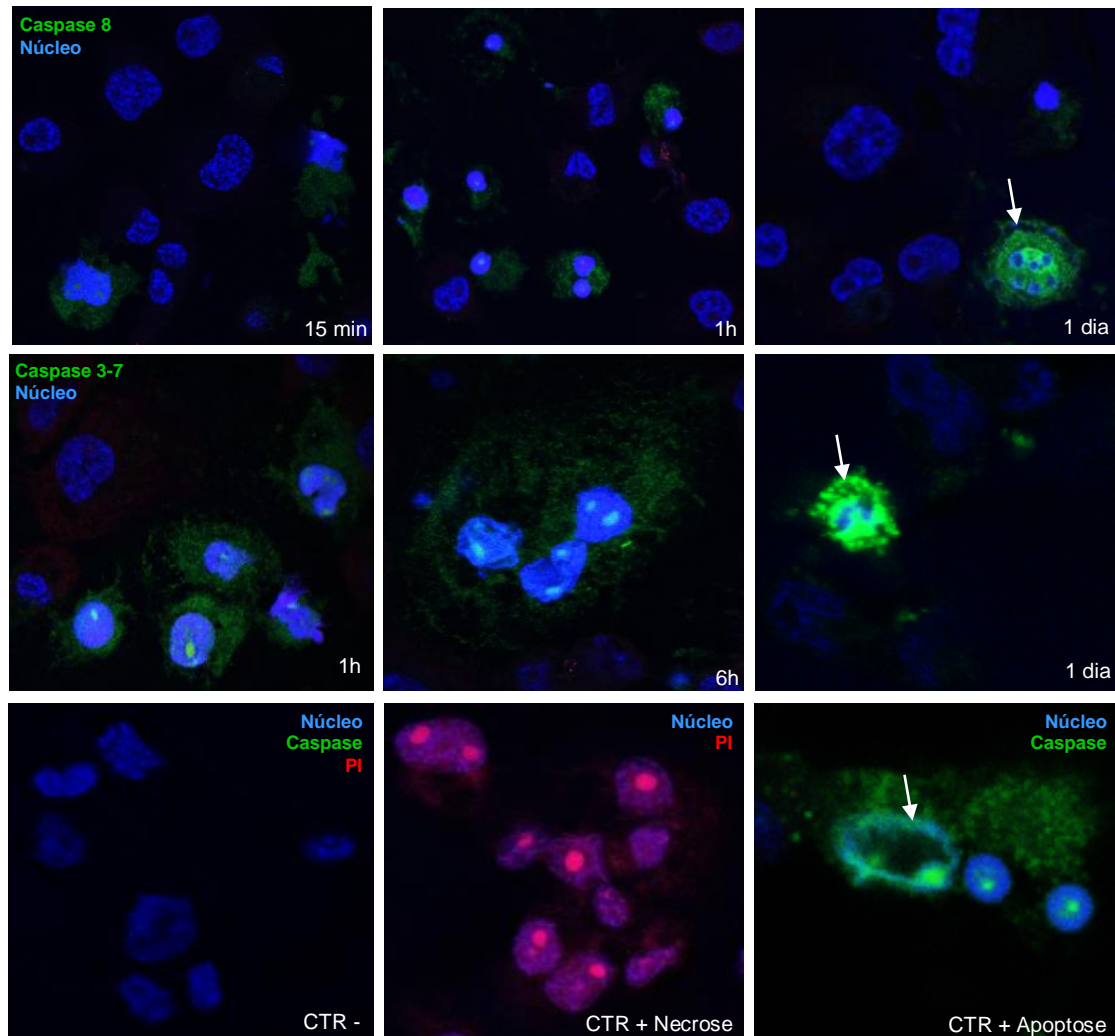


Figura 6. Activação de caspases envolvidas na indução da via apoptótica.

A activação da caspase 8 (a) e das caspases 3/7 (b) foi seguida durante 4 e 24h de infecção, respectivamente. As diferenças entre as percentagens da activação das caspases foram consideradas significativas para valores de $p < 0,05$ (*) e $p < 0,01$ (**). Imagens representativas do perfil de activação das caspases ao longo do tempo são apresentadas (c). No tempo um dia e no controlo positivo as setas brancas assinalam exemplos de células onde houve activação das caspases. O controlo negativo são os macrófagos não infectados e os controlos positivos de necrose e de apoptose (por camptotecina).

4. CONCLUSÕES

As MNTs e a sua interacção com o sistema imunitário é um assunto cada vez mais discutido na literatura, devido ao aumento de indivíduos com infecções provocadas por este tipo de micobactérias. Sendo principalmente preocupante entre os indivíduos imunodeprimidos.

Entre as infecções provocadas pelas MNTs, a infecção pulmonar é a mais relevante. Por esta razão, foi usado um modelo de macrófagos alveolares humanos. Todos os isolados clínicos de MNTs foram capazes de persistir no interior destas células, demonstrando que existe uma relação entre virulência e persistência celular. Apesar das MNTs serem consideradas oportunistas, estes resultados confirmam a sua capacidade de infectar sistemas imunocompetentes.

As MNTs estudadas, contrariamente ao que se sucede com o *M. tuberculosis*, não provocaram o bloqueio da maturação do fagossoma num estadio que exclui a presença de Rab7. Os perfis de maturação dos fagossomas foram semelhantes para todas as MNTs independentemente de terem sido eliminadas, ou terem persistido no interior dos macrófagos. Estes resultados podem ser explicados pela existência duma susceptibilidade diferencial das MNTs à concentração de hidrogenião. Apenas o *M. smegmatis* foi eliminado, *in vitro*, num meio com um pH similar ao do fagolisossoma.

Os resultados obtidos para a produção de NO e IL-10 sugerem que estes mediadores não cruciais para o desfecho destas infecções.

Os perfis de activação dos mediadores da apoptose observados aparentemente estão em desacordo com os descritos na literatura. Contudo, é possível estabelecer uma relação entre estes perfis e o desfecho da infecção pelas MNTs estudadas. Estes resultados sugerem que a indução de apoptose será importante para a persistência intracelular destas micobactérias, sendo contudo necessário elucidar os mecanismos moleculares envolvidos.

5. PERSPECTIVAS FUTURAS

A patogénese das MNTs está ainda longe de ser totalmente conhecida e elucidada. Este trabalho representa um pequeno passo nesse caminho mas muitos outros são necessários para elucidar os mecanismos moleculares envolvidos na persistência intracelular das MNTs.

O estudo da expressão génica induzida pelas MNTs, por exemplo pela reacção de polimerização em cadeia em tempo real usando iniciadores específicos, permitiria complementar os resultados obtidos para o NO e a IL-10. O estudo do envolvimento do TNF- α , que desempenha um papel fundamental na resposta imunitária das infecções por micobactérias e na indução da apoptose seria outro aspecto importante.

A confirmação do papel desempenhado pela morte celular mediada pelas caspases 3, 7 e 8 e do bloqueio parcial da acidificação do fagossoma são outros estudos relevantes. Neste caso, a avaliação da persistência intracelular das MNTs na presença de inibidores selectivos das caspases e da acidificação, podem elucidar o papel desempenhado por estes efectores.

Um outro aspecto, que não foi explorado neste trabalho, são as características das MNTs que estão envolvidas na sua virulência, bem como a alteração das mesmas durante a infecção.

Este trabalho representa um ponto de partida para a compreensão dum processo multifactorial e complexo de interacção entre as MNTs e um dos seus hospedeiros: o Homem.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Armstrong, J. A. and D'Arcy Hart, P. (1975). Phagosome-Lysosome Interactions in Cultured Macrophages Infected with Virulent Tubercle Bacilli. *The Journal of Experimental Medicine*. **142**: 1-16
2. Balcewicz-Sablinska, M. K., Gan H. and Remold, H. G. (1999). Interleukin 10 Produced by Macrophages Inoculated with *Mycobacterium avium* Attenuates Mycobacteria-Induced Apoptosis by Reduction of TNF- α activity. *The Journal of Infectious Diseases*. **180**: 1230-1237.
3. Bhattacharyya, A., Pathak, S., Bosak, C., Law, S., Kundu, M. and Basu, J. (2003). Mechanisms of Signal Transduction: Execution of Macrophage Apoptosis by *Mycobacterium avium* through Apoptosis Signal-regulating Kinase 1/p38 Mitogen-activated Protein Kinase Signaling and Caspase 8 Activation. *The Journal of Biological Chemistry*. **278**: 26517-26525.
4. Biosource international. Apoptosis Applications & Glossary. Method Booklet 3. Biosource international.
5. Bohsali, A., Abdalla, H., Velmurugan, K. and Briken, V. (2010). The non-pathogenic mycobacteria *M. smegmatis* and *M. fortuitum* induce rapid host cell apoptosis via a caspase-3 and TNF dependent pathway. *BioMed Central Microbiology*. **10**: 237-249.
6. Bugalhao, Joana. (2013). *Mycobacterium tuberculosis* subversion of host vesicular traffic pathways. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Aplicada. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa
7. Chen, M., Gan, H. and Remold, H. G. (2006). A Mechanism of Virulence: Virulent *Mycobacterium tuberculosis* Strain H37Rv, but Not Attenuated H37Ra, Causes Significant Mitochondrial Inner Membrane Disruption in Macrophages Leading to Necrosis. *The Journal of Immunology*. **176**: 3707-3716.
8. Cooper, Geoffrey M.; Hausman, Robert E. (2009). *The Cell: A Molecular Approach*, 5th ed. Sinauer Associates, Inc, Sunderland, Massachusetts.
9. Dailoux, M., Abalain, M. L., Laurain, C., Lebrun, L., Loos-Ayav, C., Lozniewski, A., Maugein, J. and the French Mycobacteria Study Group. (2006). Respiratory infections associated with nontuberculous mycobacterium in non-HIV patients. *European Respiratory Journal*. **28**: 1211-1215.
10. Desjardins, M. (1995). Biogenesis of phagolysosomes: the "Kiss and run" hypothesis. *Trends in Cell Biology*. **5**: 183-186.
11. Dumarey, C. H., Labrousse, V., Rastogi, N., Vargaftig, B. B. and Bachelet, M. (1994). Selective *Mycobacterium avium* – induced production of nitric oxide by human monocyte-derived macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*. **5**: 36-40.
12. Edinger, A. L. and Thompson, C. B. (2004). Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Current Opinion in Cell Biology*. **16**: 663-669.
13. Ehrt, S., Schnappinger, D., Bekiranov, S., Drenkow, J., Shi, S., Gingeras, T. R., Gaasterland, T., Schoolnik, G. and Nathan, C. (2001). Reprogramming of the Macrophage Transcriptome in Response to Interferon- γ and *Mycobacterium tuberculosis*: Signaling Roles of Nitric Oxide Synthase-2 and Phagocyte Oxidase. *The Journal of Experimental Medicine*. **194**: 1123-1139.
14. Falkinham III, J. O. (1996). Epidemiology of Infection by Nontuberculous Mycobacteria. *Clinical Microbiology Reviews*. **9**: 177-215.
15. Fratazzi, C., Arbeit, R. D., Carini, C., Balcewicz-Sablinska, M. K., Keane, J., Kornfel, H. and Remold, H. G. (1999). Macrophage apoptosis in mycobacterial infections. *Journal of Leukocyte Biology*. **66**: 763-764.
16. Goletti, D., Petruccioli, E., Romagnoli, A., Piacentini, M. and Fimia, G. M. (2013). Autophagy in *Mycobacterium tuberculosis* infection: A passepartout to flush the intruder out?. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. **24**: 335-343.
17. Gomes, M. S., Paul, S., Moreira, A. L., Appelberg, R., Rabinovitch, M. and Kaplan, G. (1999). Survival of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis* in Acidified Vacuoles of Murine Macrophages. *Infection and Immunity*. **67**: 3199-3206.
18. Groote, M. A. De and Huitt, -G. (2006). Infections Due to Rapidly Growing Mycobacteria. *Clinical Infectious Diseases*. **42**: 1756-1763.
19. Guirado, E., Schesinger, L. S. and Kaplan, G. (2013). Macrophages in tuberculosis: friend or foe. *Seminars in Immunopathology*. **35**: 563-583.
20. Haas, A. (2007). The Phagosome: Compartment with a License to Kill. *Traffic. A Review of Phagosome Biogenesis*.
21. Hall, C. M., Willcox, P. A., Swanepoel, C. R., Kahn, D. and Smit, R. V. Z. (1994). Mycobacterial Infection in Renal Trasplant Recipients. *CHEST*. **106**: 435-439.

22. Helguera-Repetto, A. C., Chacon-Salinas, R., Cerna-Cortes, J. F., Rivera-Gutierrez, S., Ortiz-Navarrete, V., Estrada-Garcia, I. and Gonzales-y-Merchand, J. A. (2014). Differential Macrophage Response to Slow- and Fast-Growing Pathogenic Mycobacteria. *BioMed Research International*. **2014**. Article 916521. 10 pages.
23. Henry, M. T., Inamdar, L., O'Riordain, D., Schweiger, M. and Watson, J. P. (2004). Nontuberculous mycobacteria in non-HIV patients: epidemiology, treatment and response. *European Respiratory Journal*. **23**: 741-746.
24. Herzog, H. (1998). History of Tuberculosis. *Respiration*. **65**: 5-15.
25. Hestvik, A. L. K., Hmama, Z. and Av-Gay, Y. (2005). Mycobacterial manipulation of the host cell. *FEMS Microbiology Reviews*. **29**: 1041-1050.
26. Hoefsloot, W., Ingen, J. van, Andrejak, C., Angeby, K., Bauriaud, R., Bemer, P., Beylis, N., Boeree, M. J., Cacho, J., Chihota, V., Chimara, E., Churchyard, G., Cias, R., Dasa, R., Daley, C. L., Dekhuijzen, P. N. R., Domingo, D., Drobniewski, F., Esteban, J., Fauville-Dufaux, M., Folkvardsen, D. B., Gibbons, N., Gómez-Mampaso, E., Gonzalez, R., Hoffmann, H., Hsueh, P. R., Indra, A., Jagielski, T., Jamieson, F., Jankovic, M., Jong, E., Keane, J., Koh, W. J., Lange, B., Leao, S., Macedo, R., Mannsaker, T., Marras, T. K., Maugein, J., Milburn, H. J., Mlinkó, T., Morcillo, N., Morimoto, K., Papaventsis, D., Palenque, E., Paez-Pena, M., Piersimoni, C., Polanová, M., Rastogi, N., Richter, E., Ruiz-Serrano, M. J., Silva, A., Silva, M. P. da, Simsek, H., Soolingen, D. van, Szabó, N., Thomson, R., Fernandez, M. T. T., Tortoli, E., Totten, S. E., Tyrrell, G., Vasankari, T., Villar, M., Walkiewicz, R., Winthrop, K. and Wagner, D. (2013). The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples: A NTM-NET collaborative study. *European Respiratory Journal Express*.
27. Horsburgh, R. C. Jr., Gettings, J., Alexander, L. N. and Lennox, J. L. (2001). Disseminated *Mycobacterium avium* Complex Disease among Patients Infected with Human Immunodeficiency Virus, 1985-2000. *Clinical Infectious Diseases*. **33**: 1938-1943.
28. Jonsson, B., Ridell, M., Wold, A. E. (2012). The surface lipids of non-tuberculous mycobacteria suppress production of phagocyte activating cytokines in human peripheral blood mononuclear cells. *Microbes and Infection*. **14**: 768-777.
29. Jordao, M. L. (2003). Uso de formulações lipossomais de antibióticos β -lactâmicos no tratamento de infeções por micobactérias. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa
30. Jordao, M. L. (2007). The links between membrane actin assembly by mycobacterial phagosomes and phagosome maturation, macrophage activation and pathogen killing. Dissertação de Doutoramento em Farmácia (Biologia e Genética Molecular). Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.
31. Jordao, L., Bleck, C. K. E., Mayorga, L., Griffiths, G. and Anes, E. (2008). On the killing of mycobacteria by macrophages. *Cellular Microbiology*. **10**: 529-548.
32. Jordao, L. and Vieira, O. V. (2011). Tuberculosis: New Aspects of an Old Disease. *International Journal of Cell Biology*. **2011**. Article ID 403623, 13 pages.
33. KaraKousis, P. C., Moore, R. D. and Chaisson, R. E. (2004) *Mycobacterium avium* complex in patients with HIV infection in the era of highly active antiretroviral therapy. *The Lancet Infectious Diseases*. **4**: 557-565.
34. Kaur, K., Taneja, N. K., Dhingra, S. and Tyagi, J. S. (2014). DevR (DosR) mimetic peptides impair transcriptional regulation and survival of *Mycobacterium tuberculosis* under hypoxia by inhibiting the autokinase activity of DevS sensor kinase. *BioMed Central Microbiology*. **14**: 195-203.
35. Kelley, V. A. and Schorey J. S. (2004). Modulation of cellular Phosphatidylinositol 3-phosphate levels in primary macrophages affects heat-killed but not viable *Mycobacterium avium*'s transport through the phagosome maturation process. *Cellular Microbiology*. **6**: 973-985.
36. Kusunoki, S. and Ezaki, T. (1992). Proposal of *Mycobacterium peregrinum* sp. nov., nom. rev., and Elevation of *Mycobacterium chelonae* subsp. *abscessus* (Kubica et al.) to Species Status: *Mycobacterium abscessus* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **42**: 240-245.
37. Lim, A., Allison, C., Price, P. and Waterer, G. (2010) Susceptibility to pulmonary disease due to *Mycobacterium avium*-intracellular complex may reflect low IL-17 and high IL-10 responses rather than Th1 deficiency. *Clinical Immunology*. **137**: 296-302.
38. Long, Q., Zhou, Q., Ji, L., Wu, J., Wang, W. and Xie, J. (2012). *Mycobacterium smegmatis* Genomic Characteristics Associated With its Saprophyte Lifestyle. *Journal of Cellular Biochemistry*. **113**: 3051-3055.

39. Marques, J. (2013). Mycobacteria manipulation of host proteases and inflammatory pathways during infection within human macrophages and dendritic cells. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Aplicada. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
40. O'Garra, A., Redford, P. S., McNab, F. W., Bloom, C. I., Wilkinson, R. J. and Berry, M. P. R. (2013). The Immune Response in Tuberculosis. *The Annual Review Of Immunology* **31**: 475-527.
41. Park, J. S., Tamayo, M. H., Gonzalez-Juarrero, M., Orme, I. M. and Ordway, D. J. (2006). Virulent clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* grow rapidly and induce cellular necrosis but minimal apoptosis in murine macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*. **79**: 80-86.
42. Parti, R. P. S., Srivastava, S., Gachhui, R. Srivastava, K. K. and Srivastava R. (2005). Murine infection model for *Mycobacterium fortuitum*. *Microbes and Infection*. **7**: 349-355.
43. Pattyn, S. R., Vandepitte, J., Portaels, F. and Muynck, A. De. (1971). Cases of *Mycobacterium borstelense* and *M. abscessus* infection observed in Belgium. *Journal of Medical Microbiology*. **4**: 145-149.
44. Pelosi, A., Smith, D., Brammananth, R., Topolska, A., Billman-Jacobe, H., Nagley, P., Crellin, P. K. and Coppel, R. L. (2012) Identification of a Novel Gene Product That Promotes Survival of *Mycobacterium smegmatis* in Macrophages. *PLoS ONE*. **7**: 31788-31799.
45. Piersimoni, C. and Scarparo, C. (2008). Pulmonary infections associated with non-tuberculous mycobacteria in immunocompetent patients. *The Lancet Infectious Diseases*. **8**: 323-334.
46. Piersimoni, C. and Scarparo, C. (2009). Extrapulmonary infections associated with non-tuberculous mycobacteria in immunocompetent persons. *Emerging Infectious Diseases*. **15**: 1351-1358.
47. Radtke, A. L. and O'Riordan, M. X. D. (2006). Intracellular innate resistance to bacterial pathogens. *Cellular Microbiology*. **8**: 1720-1729.
48. Riendeau, C. J. and Kornfeld, H. (2003). THP-1 Cell Apoptosis in Response to Mycobacterial Infection. *Infection and Immunity*. **71**: 254-259.
49. Rodrigues, I. (2012). Validação de um algoritmo para identificação de *Mycobacterium* spp. no diagnóstico laboratorial. Dissertação de Mestrado em Microbiologia. Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa.
50. Russell, D. G. (2001). *Mycobacterium tuberculosis*: Here Today, and Here Tomorrow. *Molecular Cell Biology*. **2**: 1-9.
51. Russell, D. G. (2007). New ways to arrest phagosome maturation. *Nature Cell Biology*. **9**: 357-359.
52. Sastry, V. and Brennan P. J. (1995). Cutaneous Infections with Rapidly Growing Mycobacteria. *Clinics in Dermatology*. **13**: 265-271.
53. Saviola, B. (2013). *Mycobacterium tuberculosis* Adaptation to Survival in a Human Host, *Tuberculosis - Current Issues in Diagnosis and Management*, Dr. Bassam Mahboub (Ed.), ISBN: 978-953-51-1049-1, InTech.
54. Sim, Y. S., Kim, S-Y., Kim, E. J., Shin, S. J. and Koh, W-J. (2012). Impaired Expression of MAPK Is Associated with the Downregulation of TNF- α , IL-6, and IL-10 in Mycobacterium abscessus Lung Disease. *Tuberculosis and Respiratory Diseases*. **72**: 275-283
55. Skogberg, K., Ruutu, P., Tukiainen, P. and Valtonen, V. V. (1995). Nontuberculous Mycobacterial Infection in HIV- Negative Patients Receiving Immunosuppressive Therapy. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. **14**: 755-763
56. Smith, I. (2003). *Mycobacterium tuberculosis* Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence. *Clinical Microbiology Reviews*. **16**: 463-496.
57. Theus, S. A., Cave, M. D., and Eisenach, K. D. (2004). Activated THP-1 cells: an attractive model for the assessment of intracellular growth rates of Mycobacterium tuberculosis isolates. *Infection and Immunity*. **72**: 1169-1173.
58. Timoteo, P. (2013). Deciphering Host Factors for Mycobacteria Internalization During Phagocytosis. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Aplicada. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
59. Tortoli, E. (2009). Clinical manifestations of nontuberculous mycobacteria infections. *Clinical Microbiology and Infection*. **15**: 906-910.
60. Tsai S-H., Shen G-H., Lin C-H., Liao J-R., Lai H-C., and Hu, S-T. (2013) Mab_3168c, a Putative Acetyltransferase, Enhances Adherence, Intracellular Survival and Antimicrobial Resistance of *Mycobacterium abscessus*. *PLoS ONE*. **8**: 67563-67571.

61. Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., and Tada, K. (1980). Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *International Journal of Cancer*. **26**: 171–176.
62. Tyagi JS, Sharma D. (2002). *Mycobacterium smegmatis* and *tuberculosis*. *Trends in Microbiology*. **10**:68–69.
63. Villanueva, A., Calderon, R. V., Vargas, B. A., Ruiz, F., Aguero, S., Zhang, Y., Brown, B. A. and Wallace, R. J. Jr. (1997). Report on an Outbreak of Postinjection Abscesses Due to *Mycobacterium abscessus*, Including Management with Surgery and Clarithromycin Therapy and Comparison of Strains by Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction. *Clinical Infectious Diseases*. **24**: 1147-1153.
64. World Health Organization. (2013). Global Tuberculosis Report 2013. World Health Organization, Geneva.
65. Zeller, M. van, Campinha, S. e Duarte, R. (2013). Micobactérias não tuberculosas – apresentação, diagnóstico e resposta ao tratamento. *Revista Portuguesa de Pneumologia*. **19**: 49-50.

7. ANEXOS

ANEXOS I

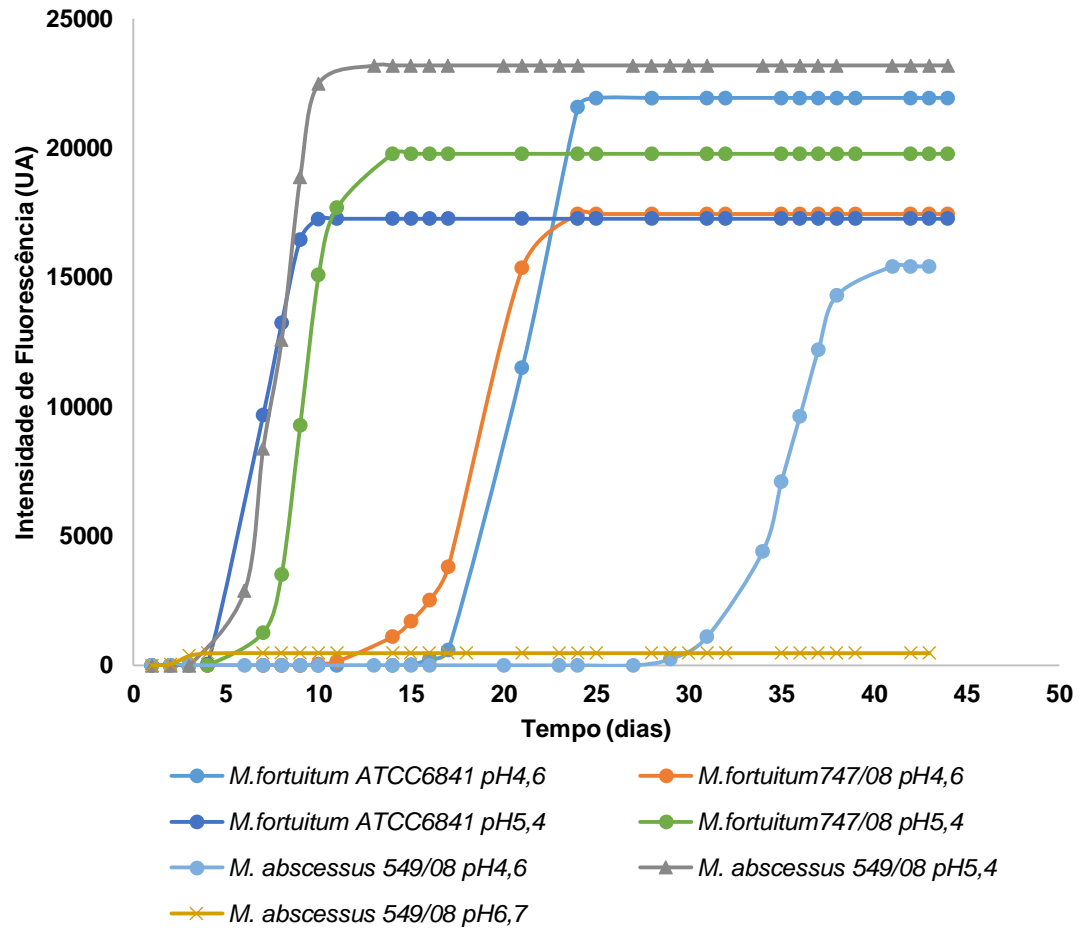
Tabela Suplementar 1. Composição dos meios utilizados no trabalho.

| Nome do meio | Composição |
|-----------------------------|---|
| Meio de cultura celular AB+ | Meio RPMI 1640 (Lonza) suplementado com 2 mM L-glutamina (Gibco), 10 mM Hepes (Gibco), 1mM piruvato de sódio (Gibco), 1500 mg/L bicarbonato de sódio (Gibco), 4500 mg/L glucose (Gibco), 50 µg/mL gentamicina (Gibco) e 10% SFB (Lonza) |
| Meio de cultura celular AB- | Meio RPMI 1640 suplementado com 2 mM L-glutamina, 10 mM Hepes, 1mM piruvato de sódio, 1500 mg/L bicarbonato de sódio, 4500 mg/L glucose e 10% SFB |
| Meio de cultura | Middlebrook 7H9 suplementado com 10% OADC e 0,05% Tween 80 |

ANEXOS II

Figura Suplementar 1. Cinéticas de crescimento a diferentes pHs das estirpes de MNTs em estudo. **a)** MNTs de crescimento rápido. **b)** MNTs de crescimento lento.

a)



b)

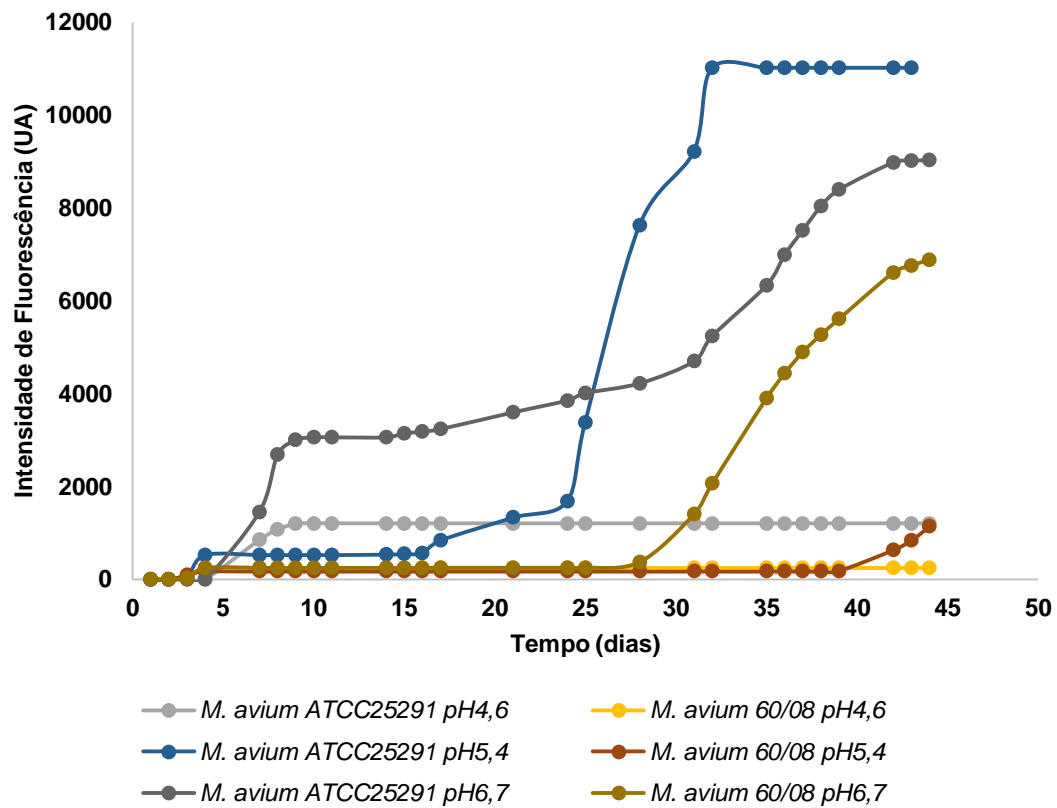


Figura Suplementar 2. Cinética de crescimento das estirpes *M. fortuitum* em estudo a pH 6,7 a partir de UFC.

